

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Filip Martinez

Povezanost polimorfizma rs2832407 gena *GRIK1* s alkoholizmom

Diplomski rad

Zagreb 2014. godina

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za molekularnu neurofarmakologiju, na Zavodu za molekularnu medicinu, Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Dubravke Švob Štrac, znanstvene suradnice IRB. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

Zahvale

Želio bi se ovim putem zahvaliti svima koji su mi pomogli tijekom mog fakultetskog obrazovanja, pogotovo mojim roditeljima, bratu, baki i djedu. Nadalje zahvaljujem se i svim profesorima koji su bili strpljivi samnom i predali mi dio svojeg znanja. Tako er, zahvaljujem se poimence, dr. sc. Dubravki Švob Štrac, znanstvenoj suradnici, što mi je uvelike i drage volje pomogla u izradi ovog diplomskog rada, te prof. dr. sc. Maji Matuli koja je pristala biti suvoditelj ovog rada i s time na sebe preuzela sve odgovornosti koje idu s tim položajem. Od srca vam hvala.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Povezanost polimorfizma rs2832407 gena *GRIK1* s alkoholizmom

Filip Martinez

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Sve više literaturnih podataka upućuje na važnu ulogu glutamata, glavnog ekscitacijskog neurotransmitora u mozgu, u posredovanju u inak alkohola na ljude. Određena istraživanja uputila su na povezanost alkoholizma i gena za glutamatne receptore, poput gena *GRIK1* koji kodira podjedinicu GluR5 kainatnih receptora. Pojedini polimorfizmi toga gena značajno utječu na djelovanje topiramata, lijeka koji se koristi u terapiji alkoholizma, a svoje učinke ostvaruje putem podjedinice GluR5 kainatnih receptora. Međutim, takvih istraživanja ima vrlo malo te su potrebne daljnje studije koje bi uključile različite etničke skupine, podtipove alkoholizma, te brojne druge čimbenike. Cilj istraživanja je utvrditi postoji li u ispitanika hrvatskog podrijetla povezanost polimorfizma rs2832407 gena *GRIK1* s razvojem alkoholizma. U tu svrhu usporedili smo raspodjelu genotipova i alela gena *GRIK1* metodom *real-time PCR* između 500-tinjak ispitanika ovisnih o alkoholu i 500-tinjak zdravih kontrolnih osoba, pri čemu smo pratili u inak spola i pušačkog statusa. Istražili smo i potencijalne razlike u frekvenciji genotipova i alela polimorfizma gena *GRIK1* u osoba ovisnih o alkoholu podijeljenih s obzirom na suicidalno i agresivno ponašanje, dobiti pod utjecajem zlorabe alkohola, kao i na tip alkoholizma prema Cloningerovoj klasifikaciji. Dobiveni rezultati trebali bi pridonijeti boljem razumijevanju uloge gena *GRIK1* u razvoju ovisnosti o alkoholu te uspješnosti odgovora na terapiju, posebice u slučaju primjene topiramata.

(40 stranica, 16 slika, 10 tablica, 55 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: alkoholizam, gen *GRIK1*, glutamat, polimorfizam, rs2832407

Voditelj: Dr. sc. Dubravka Švob Štrac, znanstvena suradnica IRB

Su-voditelj: Izv. prof. dr. sc. Maja Matulić, PMF

Ocjenitelji:

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

Association study of rs2832407 *GRIK1* gene polymorphism with alcoholism

Filip Martinez

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb

There are growing data suggesting an important role of glutamate, the main excitatory neurotransmitter for the brain in the effects of alcohol. Some studies demonstrated an association between alcoholism and genes coding glutamate receptors, such as *GRIK1* gene which codes for Glu5 subunit of kainate receptors. Certain *GRIK1* polymorphisms have a significant influence on the action of topiramate, a drug used in alcoholism treatment, which acts via Glu5 subunit of kainate receptors. However, as there are only few such studies, further research is needed, especially on different ethnic groups, alcoholism subgroups and including numerous other parameters. The aim of this study is to determine whether there is an association between *GRIK1* gene polymorphism rs2832407 and development of alcoholism in subjects of Croatian origin. For that purpose we compared the frequency of *GRIK1* genotypes and alleles, with *real-time PCR* method, between ~500 alcohol-dependent patients and ~500 healthy control subjects, considering the effect of gender and smoking status. We also investigated potential differences in the frequency of *GRIK1* genotypes and alleles in alcoholics, subdivided according to suicidal and aggressive behavior, the onset age for alcohol abuse and the type of alcoholism according to Cloninger classification. Our results should improve our understanding of the role of *GRIK1* gene in alcoholism and its treatment, especially in the case of topiramate therapy.

(40 pages, 16 figures, 10 tables, 55 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: alcoholism, *GRIK1* gene, glutamate, polymorphism, rs2832407

Supervisor: Dubravka Švob Štrac, PhD, Research Associate, RBI

Co-supervisor: Assoc. Prof. Maja Matulić, PhD, Faculty of Science

Reviewers:

Thesis accepted:

POPIS KRATICA

ACD – dekstroza citratne kiseline (*acid citrate dextrose*)

ADH – alkohol-dehidrogenaza

ALDH – aldehid-dehidrogenaza

AUD – poremećaji uzimanja alkohola (*alcohol use disorders*)

DSM-III(IV) - Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 3rd. Edition (4th. Edition)

EDTA – etilen-diamin-tetraoctena kiselina

FRET – energetski transfer tipa Förster (*Förster-type energy transfer*)

GABA - -amino-masla na kiselina

HRSD - Hamilton Rating Scale for Depression

ICD- Me unarodna klasifikacija bolesti (*International Classification of Diseases*)

MGB – ligand manjeg utora DNA (*minor groove binder*)

NFQ – nefluorescencijski prigušiva (*nonfluorescent quencher*)

NMDA – N-metil-D-aspartat

PCR – lančana reakcija polimerazom (*polymerase chain reaction*)

PTSP - posttraumatski stresni poremećaji

RCLB – pufer za lizu eritrocita (*red cell lysis buffer*)

RPM – okretaj u minuti (*rotation per minute*)

RT-PCR – lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (*real time polymerase chain reaction*)

SCID – strukturirani klinički intervju (*structured clinical interview*)

SDS – natrij-dodecil sulfat

SE pufer – natrij-EDTA pufer

SNP – polimorfizam jednog nukleotida (eng. *single nucleotide polymorphism*)

SŽS – središnji živčani sustav

TE pufer – tris-EDTA pufer

SADRŽAJ

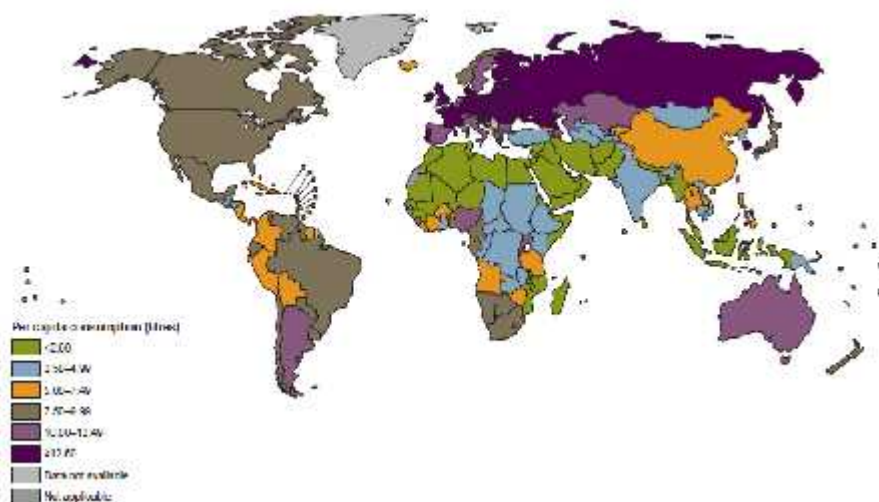
1. Uvod.....	1
1.1. Alkoholizam.....	1
1.2. Alkohol kao uzrok bolesti i ozljeda.....	2
1.3. Genetska komponenta alkoholizma.....	3
1.4. Glutamatni receptori i glutamat.....	4
1.5. Polimorfizam gena GRIK1.....	6
2. Cilj istraživanja.....	8
3. Materijali i metode.....	9
3.1. Ispitanici.....	9
3.2. Izolacija DNA iz krvi.....	10
3.3. Određivanje genotipa metodom real-time PCR.....	12
3.4. Statistička obrada podataka.....	15
4. Rezultati.....	16
4.1. Ispitanici uključeni u istraživanje.....	16
4.2. Utvrđivanje genotipova.....	17
4.2.1. Raspodjela ispitanika prema spolu.....	18
4.2.2. Raspodjela ispitanika prema pušačkom statusu.....	22
4.2.3. Raspodjela ispitanika ovisnih o alkoholu.....	24
5. Rasprava.....	29
6. Zaključak.....	32
7. Literatura.....	33
8. Životopis.....	39

1. UVOD

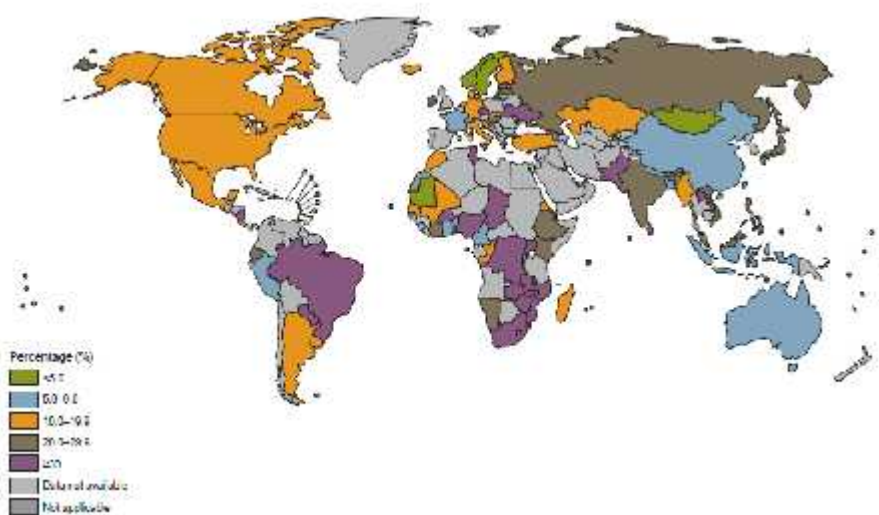
1.1 Alkoholizam

Alkoholizam je kronična i često progresivna bolest koju odlikuju problemi s kontrolom unosa alkoholnog pića, zaokupljenost alkoholom, nastavak konzumacije alkohola, čak i kad uzrokuje probleme, progresivno povećanje doze da bi se zadovoljila potreba (tolerancija), te pojava simptoma ustezanja kod naglog prestanka ili smanjenja uzimanja alkohola (fizička ovisnost (www.mayoclinic). Svjetska zdravstvena organizacija (eng. *World Health Organisation*, WHO) je 1952. godine definirala alkoholizam kao bolest, a alkoholičara kao bolesnika, kod kojeg se zbog prekomjerne i dugotrajne konzumacije alkoholnih pića pojavljuju fizička i psihička ovisnost, te zdravstveni, socijalni i ekonomski problemi. Ljudi pogođeni tom ovisnošću gube sposobnost procjene koliko će popiti, koliko će dugo piti i koje će biti posljedice njihovog opijanja (www.mayoclinic).

Da bi se lakše utvrdila rizična skupina ljudi koji konzumiraju alkohol, u nekoj regiji prati se količina popijenog alkohola po glavi stanovnika (Slika 1.), apstinencija i teško epizodno pijenje (Slika 2.). Količina popijenog alkohola po glavi stanovnika je statistički podatak koji nam može prikazati samo općenito stanje u nekoj državi. Apstinencija nam pak govori o osobama starijim od 15 godina koji nikad nisu konzumirali alkohol ili nisu konzumirali alkohol u posljednjih 12 mjeseci, dok se teško epizodno pijenje definira kao pijenje kod kojeg je najmanje u jednoj situaciji u proteklih 7 dana popijeno više od 60 grama istog alkohola. Svaki se način konzumacije opisuje ocjenom od 1 do 5, te nam govori o riziku kojem je izložena pojedina osoba. Na primjer, u Indiji koja ima nisku potrošnju alkohola po glavi stanovnika (Slika 1.), postoji visoki postotak teškog epizodnog pijenja (Slika 2.), dok u Francuskoj koja ima visoku potrošnju po glavi stanovnika (Slika 1.), postoji niski postotak teškog epizodnog pijenja (Slika 2.) što ukazuje na umjereniji, ali i drugačiji obrazac konzumacije alkohola (WHO, 2011).



Slika 1. Količina popijenog alkohola po glavi stanovnika (u litrama) za 2005. godinu (WHO, 2011)



Slika 2. Pojava teškog epizodnog opijanja u muškaraca za 2004. godinu (WHO, 2011)

1.2 Alkohol kao uzrok bolesti i ozljeda

Zloupotreba alkohola je jedan od vodećih negativnih čimbenika na zdravlje u svijetu. Svake godine uzrokuje oko 2.5 milijuna smrtnih slučajeva s preko 60 vrsti bolesti i ozljeda kojima je on glavni uzročnik. Zabrinjavajuća je činjenica da je zloupotreba alkohola najsmrtonosnija za ljude

mla ih dobnih skupina, te je vode i rizi ni faktor smrti me u muškarcima u dobi od 15-59 godina (WHO, 2011).

Alkohol ošte uje svaki organ i organski sustav u tijelu. S medicinskog gledišta, najvažnije bolesti koje su posljedica ovisnosti o alkoholu su one krvožilnog, živ anog i hepato-gastrointestinalnog sustava. U probavnom sustavu poteško e mogu varirati od pove ane intestinalne pokretljivosti i gastropatije koje dovode do jutarnjih mu nina i proljeva, pa sve do kroni nog pankreatitisa. Neke od ostalih posljedica alkoholizma su ciroza jetre, epilepsija, pove an rizik od nastanka kardiovaskularnih bolesti, poreme aji u prehrani, alkoholna demencija, seksualna disfunkcija, razli iti tumori, te brojna ošte enja središnjeg i perifernog živ anog sustava (Testino, 2008). Od psihijatrijskih poreme aja naj eš e su primije ene anksioznost i depresija, a za vrijeme prekida uzimanja alkohola može do i do pojave halucinacija i op e zbunjenosti (Wetterling i sur. 2006). Žene ovisne o alkoholu osim anksioznosti i depresije, naj eš e podliježu dodatnim psihijatrijskim poreme ajima kao što su bulimija, napadi panike, posttraumatski stresni poreme aj (PTSP) i grani ni poreme aj li nosti, dok muškarci ovisni o alkoholu esto pokazuju simptome narcisoidnog i antisocijalnog poreme aja, shizofrenije, impulzivnog ponašanja, bipolarnog poreme aja, manjka koncentracije, te hiperaktivnosti (Karoll, 2002).

Alkohol utje e ne samo na pojavu bolesti, ve i na njezin tijek, ovisno o koli ini konzumiranog alkohola i o obrascu pijenja. Me unarodna klasifikacija bolesti (ICD- International classification of diseases) uklju uju alkohol u preko 30 definicija bolesti, od ega su najvažniji poreme aji konzumacije alkohola (AUD - alcohol use disorders), a još u preko 200 klasifikacija bolesti alkohol je utvr en kao dio uzroka bolesti (WHO).

1.3. Genetska komponenta alkoholizma

Provedena su mnoga istraživanja kojima je cilj bio provjeriti postoji li povezanost genetske podloge pojedinca i njegove predispozicije za razvoj ovisnosti o alkoholu. Pojedina istraživanja su pokazala da se ovisnost o alkoholu naslje uje u oko 50% slu ajeva (Goldman i sur., 2005), te da na rizik razvoja alkoholizma utje e složeno me udjelovanje genetskih i okolišnih imbenika (Bierut i sur., 2010). No, izme u razli itih populacija u svijetu postoje odre ene genetske razlike koje utje u na rizik nastanka ovisnosti o alkoholu (Radel i Goldman, 2001). Tako ljudi afri kog i

indijanskog porijekla posjeduju određene varijante gena za enzim alkohol-dehidrogenazu (ADH), što za posljedicu ima bržu razgradnju alkohola u organizmu, a time i brže nakupljanje acetaldehida, toksičnog nusprodukta metabolizma. U takvih se osoba javljaju teži simptomi opijanja, što utječe na smanjeni rizik razvoja alkoholizma (Radel i Goldman, 2001). Kod azijskih populacija određena varijacija enzima aldehid-dehidrogenaze (ALDH), uzrokuje sporiju razgradnju toksičnog produkta acetaldehida i samim time teže simptome opijanja alkoholom (Thomasson i sur., 1991).

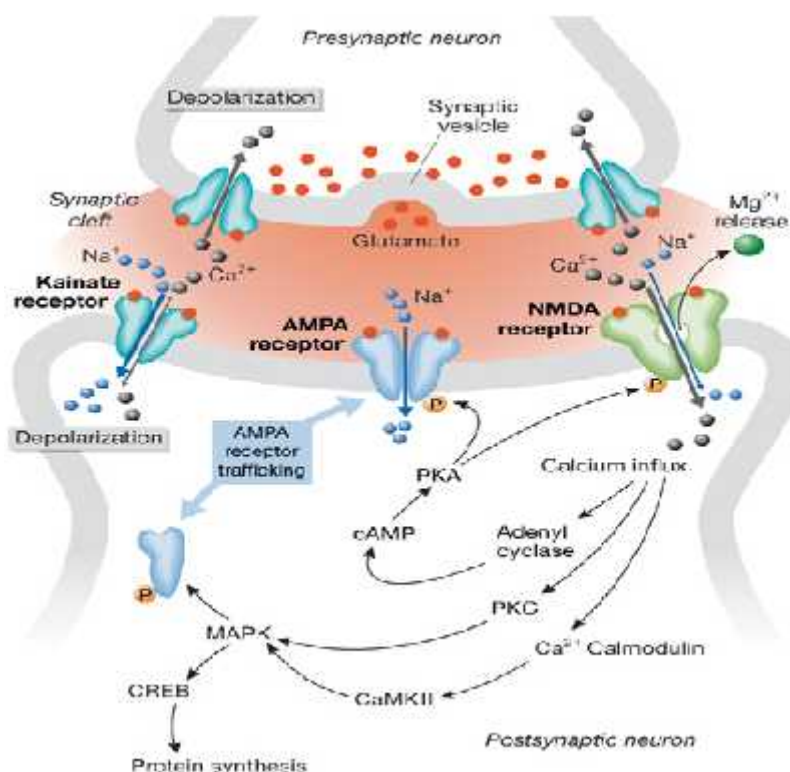
Nepostojanje klasičnog obrasca nasljeđivanja alkoholizma upućuje na uključivanje mnogobrojnih gena (poligenska bolest) i njihovu složenu interakciju s okolišem (McGue, 1999). Alkohol u mozgu djeluje na različite strukture smještene u staničnim membranama i uključene u unutarstanični prijenos signala, poput receptora za neurotransmitore i neurohormone, te ionske kanale. Osim već prije spomenutih gena uključenih u metabolizam alkohola (ADH i ALDH), s ovisnošću o alkoholu povezuju se sve više i geni dopaminskog, glutamatnog, opioidnog, kolinskog, serotoniniskog, te neurotransmitskog sustava -amino-maslene kiseline (GABA) (Kalsi i sur., 2009; Kimura i Higuchi, 2011; Köhnke, 2008; Oroszi i Goldman, 2004), te se utvrđuje povezanost velikog broja polimorfizama jednog nukleotida (eng. *single nucleotide polymorphism*, SNP) s alkoholizmom.

1.4 Glutamatni receptori i glutamat

Glutamat je jedna od neesencijalnih aminokiselina, odnosno, može se sintetizirati u tijelu pomoću drugih molekula i to najčešće -ketoglutarata i glutamina. Koristi se kao sastavni dio u izgradnji proteina, ali i sama ima veoma važnu funkciju. Glutamat se proizvodi u svim tjelesnim stanicama, pa tako i u neuronima, te predstavlja najobilniji ekscitacijski neurotransmitor u središnjem živčanom sustavu. Kao neurotransmitor, uključen je u neuroliferativne, neurotoksične, neurodegenerativne i neuromodulatorne procese, te je ključna komponenta u pamćenju i učenju (Kranzler i sur. 2009). Glutamat se kao neurotransmitor skladišti u sinaptičkim vezikulama, a jednom oslobođen u sinaptičku pukotinu, veže se na glutamatne receptore i tako ostvaruje svoje učinke (Slika 3.) (Guo i sur. 2009).

Prema molekularno biološkoj klasifikaciji glutamatni receptori se dijele na ionotropne i metabotropne receptore. Ionotropni glutamatni receptori su kanali aktivirani ligandom. Podjeljeni

su u tri podskupine: receptori za N-metil-D- aspartatnu kiselinu (NMDA), receptori za α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol-propionatnu kiselinu (AMPA) i receptori za kainsku kiselinu (KA). Receptori NMDA su ekscitacijski receptori povezani s natrijevim, kalijevim i kalcijevim ionskim kanalima. Receptori AMPA i KA su heterotetramerni proteinski kompleksi koji tvore ionske kanale aktivirane ligandom (Guo i sur. 2009). Kao i NMDA, KA i AMPA su također ekscitacijski receptori propusni za Na^+ i K^+ ione (Gass i Olive, 2008). Metabotropni glutamatni receptori (mGluR) su receptori spojeni s G-proteinima, a građeni su od sedam transmembranskih domena. Ovi receptori prema sličnostima sekvence, afinitetu za agoniste i unutarstaničnim putevima prijenosa signala, mogu se podijeliti u tri skupine. Receptori prve skupine (mGluR1 i 5) spajaju se s proteinima Gq (Gass i Olive, 2008) i aktiviraju signalni put inozitol fosfata (PI) i drugih glasnika diacilglicerola i 1,4,5-inozitoltrifosfata (IP_3) kroz aktivaciju fosfolipaze C. Receptori druge (mGluR2 i 3) i treće skupine (mGluR4, 6, 7 i 8) spajaju se s proteinima Gi/o, negativno reguliraju aktivnost adenil ciklaze, te smanjuju količinu cAMP-a (Guo i sur, 2009).



Slika 3. Glutamatergi na sinapsa (prema Voglis i Tavernarakis, 2006)

Glutamatergi na neurotransmisija je veoma zanimljiva u svjetlu ovisnosti o alkoholu i njenog liječenja. Glutamatergi koji eferentni živci iz prefrontalnog korteksa, amigdale i hipokampusa, inerviraju stanice ventralnog tagmentalnog područja i ovojnice nukleusa akumbesa, pri čemu ubrzavaju dopaminergičku transmisiju u tim mjestima koja su ključna za „put nagrade“. Alkohol modulira glutamatergičku neurotransmisiju, pri čemu se stvaraju dugoročne neurobiološke promjene, koje mogu uzrokovati simptome ovisnosti o alkoholu. Istraživanja na životinjama su pokazala da slabljenjem glutamatergičnih u inakom dolazi do smanjenja osjećaja nagrade prilikom konzumacije alkohola i pojave ponašanja koje vodi u relaps. U prilog uložiti glutamatergičnu neurotransmisiju u razvoju ovisnosti o alkoholu, govore pozitivni rezultati tretmana akamprostatom i topiramatom, lijekovima koji moduliraju glutamatergičnu aktivnost (Kranzler i sur. 2009; Ray i sur 2009).

Akutno izlaganje alkoholu inhibira funkciju receptora NMDA ((Lovinger i sur., 1989; Woodward, 2000). Naime, smanjena ekspresija receptora NMDA i njihova sinaptička funkcija, s povezanim promjenama ponašanja utvrđena je nakon kronične primjene alkohola (Abraham i sur., 2013; Holmes i sur., 2012; Meinhardt i sur., 2013). Funkcija ionotropnih AMPA i kainatnih receptora također je promijenjena nakon izlaganja alkoholu, ali promjene nisu toliko izražene kao u slučaju receptora NMDA (Costa i sur., 2000; Dildy-Mayfield i Harris, 1992; Lovinger i sur., 1989; Möykkynen i sur., 2003). Dakle, alkohol inhibira funkcije svih ionotropnih glutamatnih receptora, ali uloga kainatnih receptora u ovisnosti o alkoholu nije toliko dobro istražena poput receptora NMDA i AMPA. Tek posljednjih godina pristupačnost visoko selektivnih agonista i antagonista omogućila je detaljnija istraživanja kainatnih receptora.

1.5 Polimorfizam gena *GRIK1*

Proteklih nekoliko desetljeća, puno se istraživanja fokusiralo na razumijevanje specifičnih genetičkih faktora koji pridonose riziku stvaranja ovisnosti o alkoholu, kao i na razvoj lijekova kojima bi se mogao liječiti alkoholizam. Tako je i uloga gena *GRIK1* u alkoholizmu postala zanimljiva, budući da kodira za podjedinicu GluR5 kainatnog receptora koja selektivno veže topiramat, lijek u terapiji alkoholizma (Ray i sur 2009). Sam gen *GRIK1* sastoji se od 18 eksona koji sadrže 403 kb i nalaze se na kromosomu 21q22. U Europljana je do danas utvrđeno bar 8 različitih haplotipova s tim genom. Poznate su dvije izoforme ljudskog GluR5 koje nastaju

alternativnim izrezivanjem transkripata *GRIK1* gena. One predstavljaju potencijalne funkcionalne polimorfne varijacije, koje mogu utjecati na sastavljanje i unutarstani u lokalizaciju kainatnih receptora. Kranzler i sur. (2009) su pokazali da pojedine varijacije u genu koji kodira za podjedinicu GluR5 glutamatnog receptora doprinose riziku pojave ovisnosti o alkoholu. Naime, ovi autori pronašli su tri različita polimorfizma (single nucleotide polymorphism, SNP) potencijalno povezana s ovisnošću o alkoholu. Pri tome je polimorfizam rs2832407 pokazao posebno snažnu mogućnost povezanosti s alkoholizmom.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je utvrditi postoji li u ispitanika hrvatskog podrijetla povezanost polimorfizma rs2832407 gena *GRIK1* s razvojem alkoholizma.. U tu svrhu usporedila se raspodjela genotipova i alela gena *GRIK1* između ispitanika ovisnih o alkoholu i zdravih kontrolnih osoba, pri čemu se pratio i spol i pušački status. U sklopu istraživanja istražile su se potencijalne razlike u frekvenciji genotipova i alela polimorfizma gena *GRIK1* u ispitanika ovisnih o alkoholu podijeljenih s obzirom na suicidalno i agresivno ponašanje, dob po etka zlouporabe alkohola, kao i na tip alkoholizma prema Cloningerovoj klasifikaciji. Dobiveni rezultati trebali bi pridonijeti boljem razumijevanju uloge gena *GRIK1* u razvoju ovisnosti o alkoholu, te doprinijeti uspješnosti odgovora na terapiju, posebice u slučaju primjene topiramata, lijeka u terapiji alkoholizma, a koji svoje učinke ostvaruje putem podjedinice GluR5 glutamatnih kainatnih receptora.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Ispitanici

Ovo je istraživanje obuhvatilo 1082 ispitanika: 555 osoba ovisnih o alkoholu (448 muškaraca i 107 žena) i 527 zdravih kontrolnih osoba (466 muškarca i 61 žena). Svi sudionici su bili hrvatskog podrijetla i stanovnici Zagrebačke županije. Svaki od sudionika je svojevolumno pristao sudjelovati u istraživanju, što je potvrdio pismenim informativnim pristankom i doniranjem uzorka vlastite krvi. Alkoholici su primljeni na liječenje u Psihijatrijsku bolnicu Vrapče, zbog simptoma uzrokovanim sindromom ustezanja uslijed naglog prekida konzumiranja alkohola. Simptomi su bili nepsihotičnog tipa, a njihov intenzitet dosegaio je najvišu razinu oko tjedan dana nakon što su primljeni u bolnicu. Tijekom prijema u bolnicu, mnogi ispitanici su bili akutno intoksicirani alkoholom, pa se intervju i uzimanje krvi obavljalo najmanje 12 sati nakon njihovog primitka u bolnicu, tako da su bili trijezni, a da još nisu primili terapiju psihoaktivnim lijekovima.

Ispitanici su prošli strukturirani klinički intervju (eng. Structured Clinical Interview-SCID), a dijagnoza alkoholizma postavljena je prema klasifikaciji DSM-IV (eng. Diagnostic and Statistical Manual Of Mental Disorders, 4th. Edition). Pokušaj samoubojstva je utvrđen primjenom dvaju mjera: odgovorom na pitanje 4 stavke 3 Hamiltonove ocjenjske ljestvice za depresiju (eng. Hamilton Rating Scale for Depression, HRSD 17-item scale) (Hamilton, 1960) i pomoću u strukturiranog psihijatrijskog intervjua, pitanjem koje se odnosi na pokušaj samoubojstva za vrijeme života.

Primjenom SCID-a i psihijatrijskog intervjua, procijenjeni su simptomi agresije, pri čemu je korištena Brown-Goodwinova skala (eng. Brown-Goodwin Scale; Brown i sur. 1979.). Upitnik koji je korišten, prilagođen je prema Brown-Goodwinovoj skali i preveden na hrvatski, te se sastojao od sedam bihevioralnih kategorija (prema Buydens-Branchey i sur. 1989). Te kategorije su bile: problemi s disciplinom u vojsci; problemi s disciplinom na poslu; napadi na druge osobe; uništavanje imovine; uhićenje radi napada kog ponašanja; druge vrste uhićenja i prekršaji koji nisu rezultirali uhićenjem. Svaka od tih kategorija procijenjena je skalom od 0 do 4 (0-bez problema, 1-jedan problematični događaj, 2-dva, odnosno malo problematičnih događaja, 3-tri, nekoliko problematičnih događaja i 4-četiri ili više, odnosno postoji problematični događaj), s tim

da je maksimalni broj bodova bio 28, a slu ajevi s 8 ili više bodova su okarakterizirani kao agresivno ponašanje (Buydens-Brachey i sur. 1989).

Osim prema pokušaju samoubojstva tijekom života i pristutnosti agresivnog ponašanja, alkoholi ari su tako er grupirani prema dobi po etka konzumacije alkohola, na one s ranijim po etkom (prije 25. godine starosti) i na one s kasnijim po etkom alkoholizma (nakon 25. godine starosti). Nadalje, ispitanici ovisni o alkoholu razvrstani su prema Cloningerovoj klasifikaciji na osobe s alkoholizmom tipa I i II (osobe ovisne o alkoholu s kombinacijom ranog po etka zlouporabe alkohola i s prisutnim agresivnim ponašanjem imaju osobine alkoholizma podtipa II, dok ovisnici s kasnim po etkom zlouporabe alkohola i bez agresije odgovaraju osobama s alkoholizmom podtipa I).

Kontrolna skupina ispitanika je sakupljena u periodu izme u 2005. i 2009. godine u Klini kom bolni kom centru Zagreb. Zdravi ispitanici su morali ispuniti upitnik s pitanjima o svojoj povijesti bolesti, puša kom statusu i navikama pušenja i konzumacije alkohola. Da bi neka osoba mogla biti dio istraživanja u sklopu kontrole, morala je zadovoljavati odre ene kriterije. Osoba nije smjela primati nikakvu medicinsku terapiju, imati trenutnih ili prijašnjih psihijatrijskih poreme aja, biti ovisnik o alkoholu ili drugim sredstvima ovisnosti, biti suicidalna, u njihovim obiteljima nije smjelo biti psihijatrijskih poreme aja (utvr eno upitnikom u odgovorima na pitanja o ispitanikovo obitelji), osoba zatim nije smjela biti u srodstvenim odnosima s drugim ispitanicima, te je trebala pripadati nativnoj etni koj grupi, odnosno predstavljati najmanje tre u generaciju koja živi u odre enoj regiji. Kao i osobe ovisne o alkoholu, i ispitanici kontrolne skupine su grupirani prema puša kom statusu u puša e i nepuša e.

Istraživanje je provedeno u skladu s Helsinškom deklaracijom, te je odobreno od strane Eti kog povjerenstva Psihijatrijske bolnice Vrap e i Eti kog povjerenstva Klini kog bolni kog centra Zagreb.

3.2 Izolacija DNA iz krvi

Osobama kontrolne skupine i osobama ovisnim o alkoholu, uzeti su uzorci krvi od 8 ml u plasti ne šprice s 2 ml antikoagulansa ACD (*eng. acid citrate dextrose*). Uzorci krvi su se pohranjivali u plasti nim epruvetama na -20°C u zamrziva u. Primjenom metode izoljavanja

(Miller i sur., 1998) napravljena je izolacija genomske DNA iz leukocita, pri čemu su se koristile sljedeće kemikalije:

- Pufer za lizu eritrocita (eng. Red cell lysis buffer, RCLB) (10 mM Tris, 5 mM MgCl₂, 10 mM NaCl, pH=7,6)
- 5 M NaCl
- Natrij- EDTA pufer (eng. Sodium EDTA, SE-buffer) (75 mM NaCl, 25 mM Na₂EDTA, pH=8,0)
- Proteinaza K (20mg/kg)
- Natrij dodecil sulfat (SDS), 10 % pH=7,2
- Etanol, 96 % i 70 %
- Tris-EDTA pufer (TE buffer) (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH=8,0)
- Izopropanol

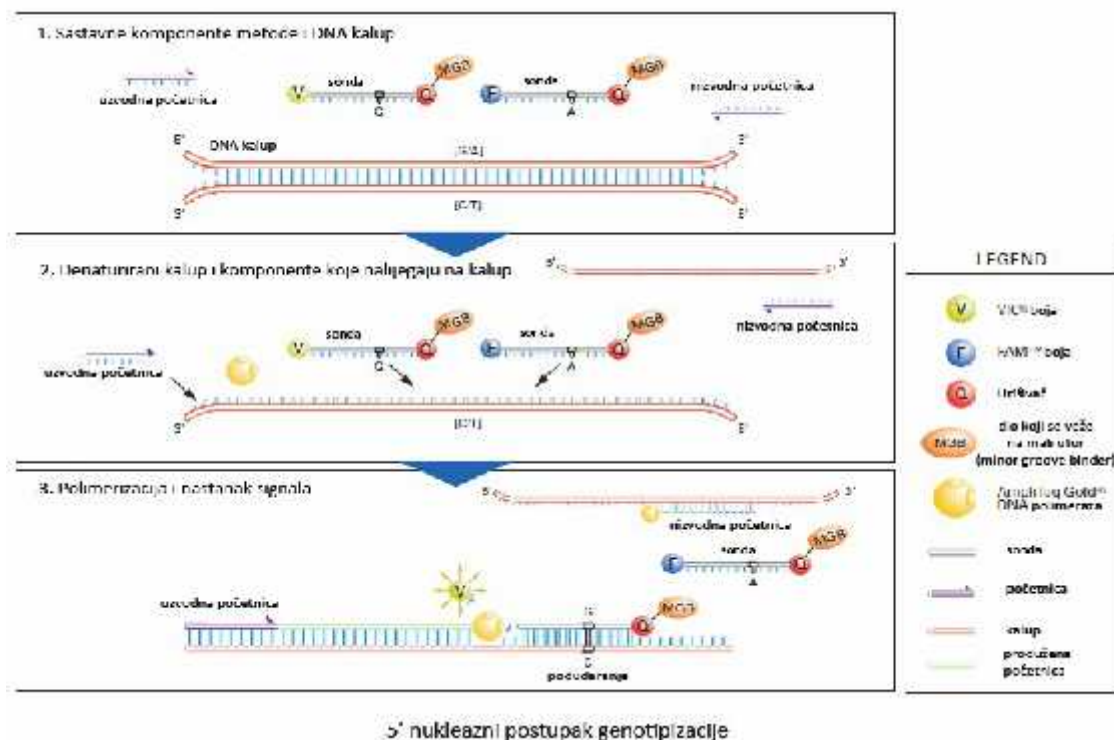
Epruvete sa smrznutim uzorcima krvi se dobro obrišu etanolom izvana. Nakon što se odmrznu, uzorci krvi se miješaju na valjkastoj miješalici 20 minuta. Nakon što je krv izmiješana, uzme se 300 µl i odvoji u sterilnu Eppendorf mikroepruvetu od 1.5 ml, na tu krv se doda 900 µl hladnog pufera za lizu eritrocita (eng. *Red cell lysis buffer, RCLB*), dobro se promješa na rotirajućoj miješalici i ostavi 10 minuta stajati na ledu. Nakon 10 minuta slijedi centrifugiranje (2 minute, 13400 x g, 4°C), pri čemu lizirani eritrociti ostanu u supernatantu, a cijeli leukociti se istalože. Supernatant se odvoji i odbaci. Talog se ponavljanjem postupka resuspendiranja u puferu za lizu eritrocita i centrifugiranja još tri puta. Na posljednji talog se doda 300 µl pufera natrij-EDTA (eng. Sodium EDTA, SE-buffer), 30 µl 10 % SDS-a, lagano se promješa i doda 1.5 µl proteinaze K. Sve se lagano promješa i ostavi na inkubaciji 1.5 do 2 sata na 56 °C uz mješanje (300 rpm) na termomikseru, pri čemu se liziraju leukociti i membrana jezgre. Nakon što se uzorci ohlade na sobnu temperaturu, u uzorak se doda 160 µl 5 mM NaCl i promiješa 10 sekundi na rotirajućoj miješalici. Centrifugiranjem (5 minuta, 13400 x g, 20°C) se DNA izdvoji u supernatant, a ostali stanični dijelovi u talog. Supernatant s DNA se prebaci u novu sterilnu mikroepruvetu od 1.5 ml i doda se 800 µl hladnog izopropanola, koji tijekom laganog miješanja zgušnjava DNA, te ona postaje vidljiva u obliku netopivih spletenih niti. Slijedi centrifugiranje (2 minute, 12000 x g, 20°C), nakon čega se odlije supernatant, a na talog se doda

250 μ l 75 % etanola. Nakon ponovnog centrifugiranja (2 minute, 12000 x g, 20°C) supernatant se odlije, a talog se suši na zraku 15-30 minuta. Na talog se zatim dodaje 100 μ l Tris-EDTA pufera (eng. TE buffer), te se ostavi oko sat vremena na 37°C uz trešnju da se DNA dobro otopi. Nakon toga, uzorci DNA se pohranjuju u hladnjak na -20°C.

3.3 Određivanje genotipa metodom real-time PCR

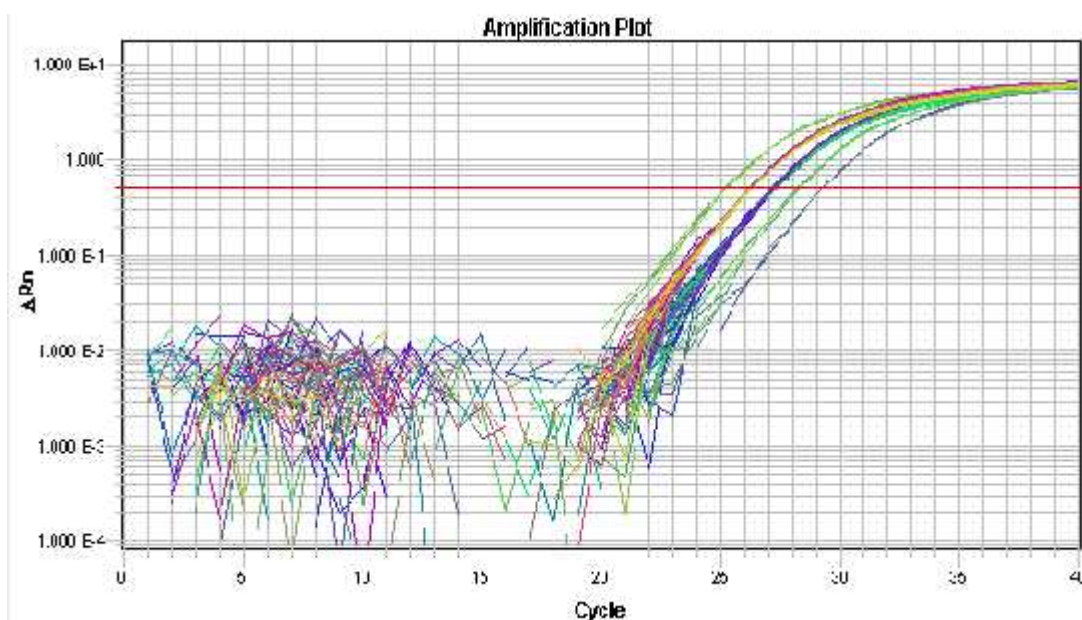
Pomoću uređaja ABI Prism 7000 Sequencing Detection System apparatus (ABI, Foster City, SAD) prema protokolu koji predlaže Applied Biosystems, utvrđivali smo prisutnost baze A ili C na mjestu polimorfizma rs2832407 smještenog unutar 3' regije gena *GRIK1* koji se nalazi na kromosomu 21q21.3, a kodira za podjedinicu GluR5 glutamatnog kainatnog receptora.

Primjenjena je metoda alelne diskriminacije polimorfizma u slučaju jedne promijenjene baze (tzv. SNP; eng. single nucleotide polymorphism) uz pomoć 5' nukleazne reakcije (eng. nuclease assay). Ova metoda, primjenom fluourogenih proba, kombinira umnažanje specifičnih odsjaka DNA lančanom reakcijom polimeraze (PCR, eng. polymerase chain reaction) i njihovu detekciju u jednom koraku (Slika 4.).



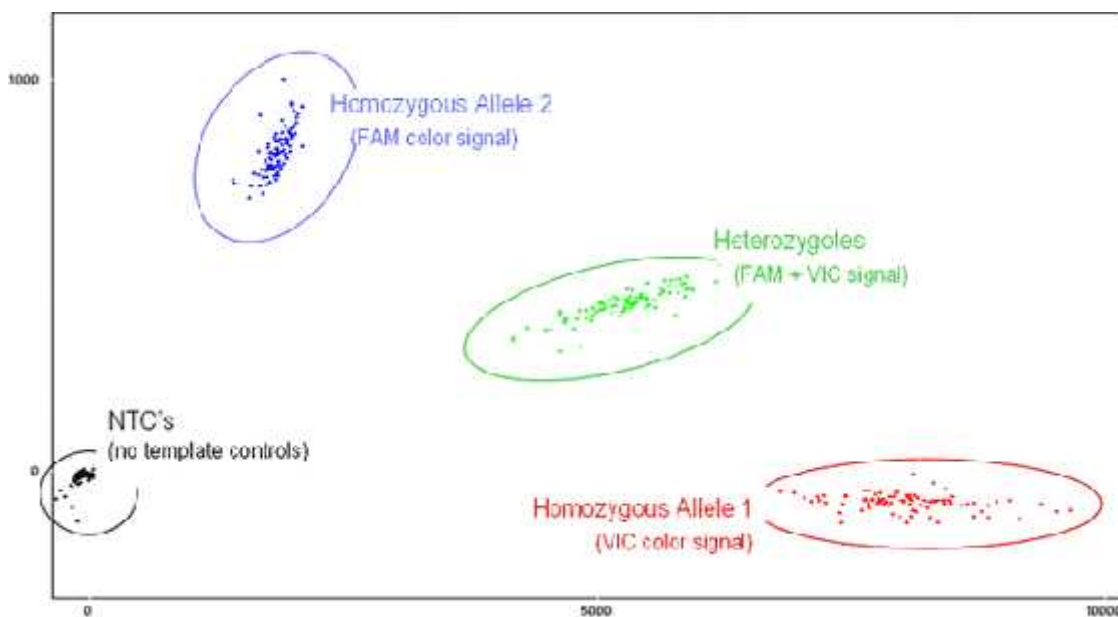
Slika 4. Metoda genotipizacije pomoću 5' nukleazne reakcije (<http://www.dnvision.com>)

U 5' nukleaznoj reakciji hibridizacijska proba, uključena u lananu reakciju polimeraze, cijepa se 5' nukleaznom aktivnošću Taq DNA polimeraze samo u slučaju kad se umnaža cijela sekvenca probe. Fluorogena proba se sastoji od oligonukleotida označenih fluorescencijskom bojom (eng. reporter) i prigušujućom bojom (eng. quencher), koje se nalaze na suprotnim stranama probe. Kao rezultat energetskog transfera Förster-tipa (eng. Förster-type energy transfer, FRET; Förster, 1948; Lakowicz, 2007), u neiskorištenoj probi blizina prigušujuće boje smanjuje fluorescencijski signal obilježavajuće boje. Tijekom lanane reakcije polimerazom cijepa se fluorogena proba, pri čemu se oslobađa obilježavajuća boja, što uzrokuje povećanje u intenzitetu njezine fluorescencije. ABI Prism 7000 Sequencing Detection System mjeri povećanje u fluorescenciji tijekom ciklusa lanane reakcije polimerazom, pri čemu detektira nakupljanje produkta PCR u stvarnom vremenu (eng. real-time PCR) u reakcijskim jažicama (Slika 5).



Slika 5. Primjer prikaza amplifikacijskih krivulja (izvorna slika)

U sustavima s dva različita alela koriste se dvije probe, od kojih je svaka obilježena drugom vrstom fluorescentnom bojom. Ako se proba i ciljna sekvenca ne podudaraju, značajno se smanjuje efikasnost hibridizacije i cijepanje probe. Prema tome, značajno povećanje u pojedinom fluorescentnom signalu FAM ili VIC upućuje na homozigotnost za alele obilježene s tom fluorescentnom bojom, dok povećanje u oba signala upućuje na heterozigotnost (Slika 6).



Slika 6. Primjer prikaza rezultata genotipizacije SNP-ova (slika preuzeta iz TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol, 2006)

Za određivanje genotipa u slučaju jedne promijenjene baze (SNP- eng. single nucleotide polymorphism) korišteni su dizajnirani TaqMan uzorci (TaqMan SNP Genotyping assay). Takvi uzorci sadrže kombinaciju dviju probojica za umnažanje ciljane polimorfne sekvence i dvije TaqMan probe MGB (eng. minor groove binder), koje služe za razlikovanje alela. Probe TaqMan MGB sastoje se od obilježavajuće boje VIC koja se nalazi na 5' kraju probe za prvi alel i boje FAM na 5' kraju probe za drugi alel. Povećana temperatura mekšanja (T_m) na danoj dužini probe, koju omogućava sekvenca MGB na 3' kraju probe, dozvoljava dizajn kraćih proba. Kraće probe se koriste da bi se dobile veće razlike u temperaturama mekšanja između odgovarajućih i neodgovarajućih proba, rezultirajući u jasnoj alelnoj diskriminaciji. Nepodudarnost probe i ciljane sekvence veću samo 1 nukleotidu smanjuje efikasnost hibridizacije probe, pa se smanjuje i količina obilježavajuće boje odcijepljene od stižavajuće probe. Svi ti faktori smanjuju proizvodnju nespecifičnih fluorescencijskih signala. Na 3' kraju svake probe, nalazi se i nefluorescencijski prigušivač (eng. nonfluorescent quencher, NFQ).

Genotipizacija započinje odmrzavanjem uzoraka genomske DNA i pripremom određenih razrijeđenja u destiliranoj vodi, tako da bi se nakon PCR-a dobilo između 1 i 20 ng DNA. Nakon toga, odpipetira se 4.5 µl pripremljenih uzoraka u svaku od jačica reakcijske ploče (eng. 96-

well reaction plate). Na to se doda 5.5 μ l reakcijske mješavine (5 μ l TaqMan univerzalne mješavine + 0.5 μ l 40 x TaqMan mješavine za genotipizaciju ciljanog SNP-a) (Tablica 1). Određivanje genotipova se provodi na uređaju ABI Prism 7000 Sequencing Detection System apparatus, nakon što se reakcijske pločice zatvore i centrifugiraju 1-2 minute na 5000 rpm. Postupak umnažanja u uređaju ABI Prism 7000 Sequencing Detection System uređaju sastoji se od početnog zagrijavanja na 95°C 10 minuta, denaturacije DNA 15 sekundi na 92°C i vezivanja po etnica/produljivanja DNA 1 minutu na 60°C. Koraci denaturacije i vezanja/produljivanja se ponavljaju 40 puta (Tablica 2).

Tablica 1. Kemikalije potrebne za genotipizaciju SNP-ova

Sastojci reakcije	Volumen u jažici	Kona na koncentracija
TaqMan glavna univerzalna mješavina	5 ml	1 x
40 x Taqman mješavina za genotipizaciju ciljanog SNP-a	0.5 ml	1 x
Genomska DNA razrije ena u dH ₂ O ¹	4.5 ml	/
Ukupni reakcijski volumen	10 ml	

¹ 1-20 ng genomske DNA

Tablica 2. Uvjeti PCR reakcije

Vrijeme i temperatura pojedine faze reakcije		
Po etni korak	Denaturacija	Vezanje/Produžavanje
	40 ciklusa	
10 min 95°C	15 sec 92°C	1 min 60°C

3.4 Statisti ka obrada podataka

U svrhu statisti ke obrade, korišten je ra unalni program „GraphPad Prism version 4.00 for Windows“ (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Skupine su uspore ivane Student t-testom prema starosti. Za zna ajnost odstupanja dobivene raspodjele genotipova od o ekivane (tzv. Hardy-Weinbergova ravnoteža), koristio se χ^2 test. Razlike u raspodjeli genotipova i alela u osoba ovisnih o alkoholu i zdravih osoba, kao i unutar podskupina ispitanika ovisnih o alkoholu odre ene su ponovo pomo u χ^2 testa. Statisti ki zna ajnim smatrane su razlike kod kojih je vjerojatnost p bila manja od 0.05.

4. REZULTATI

4.1. Ispitanici uklju eni u istraživanje

U istraživanje je uklju eno ukupno 1082 ispitanika: 555 osoba ovisnih o alkoholu (448 muškaraca i 107 žena) i 527 zdravih kontrolnih osoba (466 muškarca i 61 žena). Zdravi ispitanici osim prema spolu podijeljeni su i prema puša kom statusu, dok su ispitanici ovisni o alkoholu još dodatno podijeljeni prema dobi po etka zlouporabe alkohola (prije i poslije 25. godine života), agresivnom ponašanju, tipu alkoholizma prema Cloningerovog klasifikaciji (Cloninger i sur., 1988) i pokušaju samoubojstva tijekom života. Tablica 3 prikazuje osnovne informacije o ispitanicima uklju enim u istraživanje.

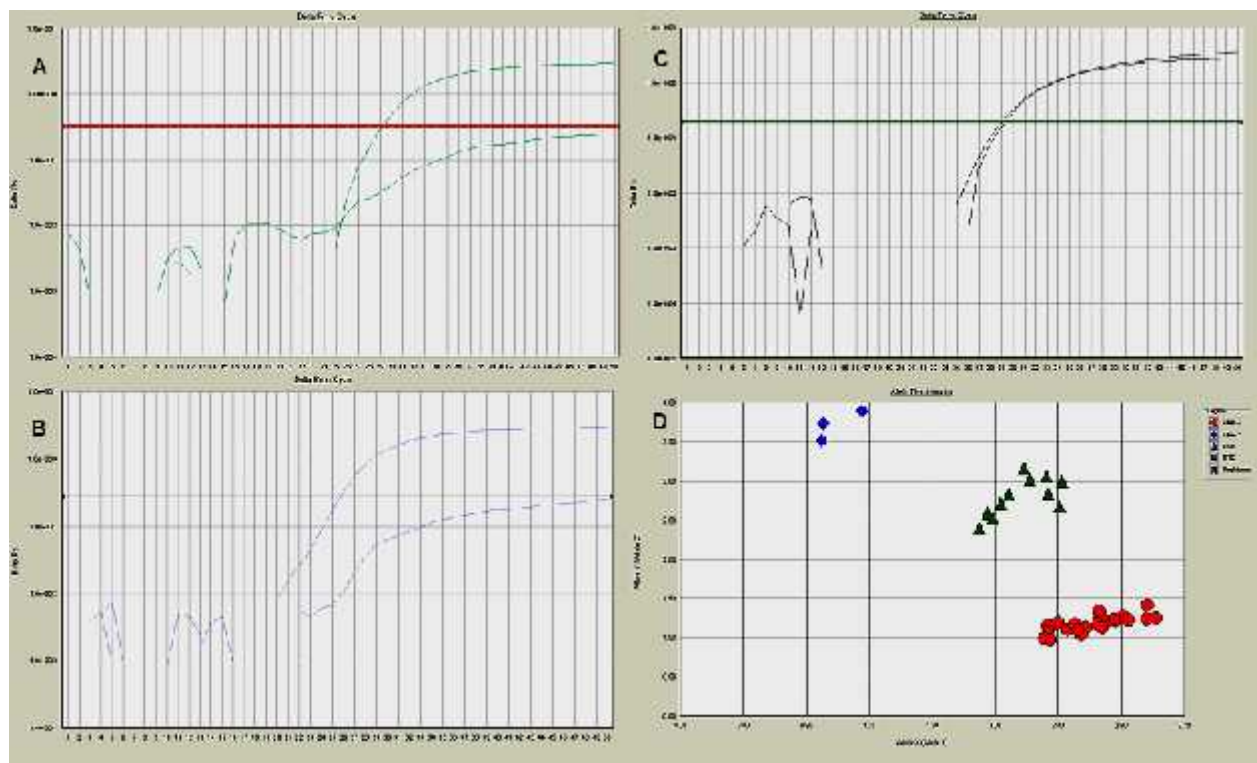
Tablica 3. Informacije o ispitanicima

	Muškarci	Žene	Ukupno
KONTROLA	466 (88.42%)	61 (11.57%)	527 (100%)
Dob	39.87 ± 0.56	42.44 ± 1.62	40.17 ± 0.53
Puša i	152 (88.37%)	20 (11.63%)	172 (100%)
Nepuša i	314 (88.45%)	41 (11.55%)	355 (100%)
ALKOHOLI ARI	449 (80.90%)	106 (19.10%)	555 (100%)
Dob	49.32 ± 0.48	51.11 ± 1.10	49.66 ± 0.44
Puša i	271 (82.12%)	59 (17.88%)	330 (100%)
Nepuša i	178 (79.11%)	47 (20.89%)	225 (100%)
Rani po etak zlouporabe alkohola (prije 25. godine života)	173 (89.64%)	21 (10.88%)	193 (100%)
Kasni po etak zlouporabe alkohola (poslije 25. godine života)	276 (76.24%)	85 (23.48%)	362 (100%)
Prisutnost agresivnog ponašanja	134 (92.41%)	11 (7.59%)	145 (100%)
Odsutnost agresivnog ponašanja	315 (76.83%)	95 (23.17%)	410 (100%)
Alkoholizam tipa I prema Cloningeru	377 (78.54%)	103 (21.46%)	480 (100%)
Alkoholizam tipa II prema Cloningeru	72 (96.00%)	3 (4.00 %)	75 (100%)
Pokušaj samoubojstva tijekom života	66 (70.98%)	27 (29.03%)	93 (100%)
Bez pokušaja samoubojstva tijekom života	383 (82.90%)	79 (17.10%)	462 (100%)

Statistički značajna razlika utvrđena je u raspodjeli pušača i nepušača između alkoholičara i zdravih ispitanika ($p < 0.0001$; χ^2 -test). Naime, unutar skupine ispitanika ovisnih o alkoholu postojala je veća frekvencija pušača nego u skupini zdravih ispitanika. Većina alkoholičara započela je s zlouporabom alkohola nakon 25. godine života (65.22%), ali nije pokazivala agresivno ponašanje (73.87%) i nije pokušala samoubojstvo tijekom života (83.24%). Nadalje, ispitanici ovisni o alkoholu pripadali su uglavnom tipu I alkoholizma prema Cloningerovoj klasifikaciji (86.49%) kojeg karakteriziraju kasniji početak alkoholizma i odsutnost agresivnosti.

4.2. Utvrđivanje genotipova metodom real-time PCR

Svih 1082 ispitanika podvrgnuti su genotipizaciji polimorfizma rs2832407 smještenog u genu *GRIK1* koji se nalazi na kromosomu 21. Na slici 7 prikazani su primjeri aplikacijskih krivulja za homozigota AA, heterozigota AC i homozigota CC, te primjer rezultata genotipizacije.



Slika 7. Primjer aplikacijske krivulje homozigota AA (A), homozigota CC (B) i heterozigota AC (C), te primjer rezultata genotipizacije (D).

Kao što je prikazano u tablici 4, frekvencije opaženih genotipova u skupini zdravih osoba i osoba ovisnih o alkoholu bile su u skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom.

Tablica 4. Dobivena i o ekivana raspodjela genotipova polimorfizma rs2832407

Genotipovi		AA	AC	CC
KONTROLA p = 0.5035	Dobiveno	80 (15.18%)	260 (49.33%)	187 (35.48%)
	O ekivano	83.68 (15.88%)	252.64 (47.94%)	190.68 (36.18%)
ALKOHOLI ARI p = 0.5247	Dobiveno	86 (16.32%)	274 (52.99%)	195 (37.00%)
	O ekivano	89.6 (17.00%)	266.8 (50.63%)	198.6 (37.68%)

*ukoliko je $p < 0.05$ rezultat nije u skladu sa HW ravnotežom

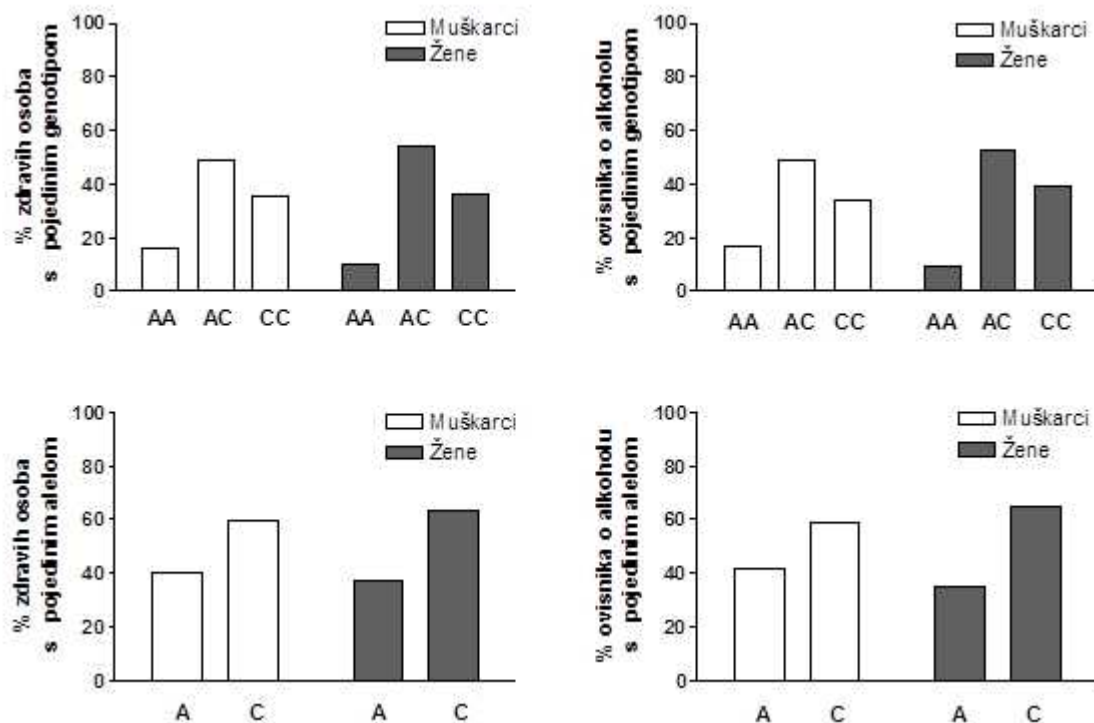
4.2.1. Raspodjela ispitanika prema spolu

U tablici 5, prikazana je u estalost pojedinih genotipova i alela za polimorfizam rs2832407 u skupini zdravih ispitanika i u skupini ispitanika ovisnih o alkoholu podijeljenih prema spolu.

Tablica 5. U estalost genotipova i alela za polimorfizam rs2832407 u skupini kontrolnih ispitanika i ispitanika ovisnih o alkoholu podijeljenih prema spolu

KONTROLA					
	AA	AC	CC	A	C
Muškarci	74 (15.88%)	227 (48.71%)	165 (35.41%)	375 (40.24%)	557 (59.76%)
Žene	6 (9.84%)	33 (54.10%)	22 (36.06%)	45 (36.88%)	77 (63.11%)
Ukupno	80 (15.18%)	260 (49.33%)	187 (35.48%)	420 (39.85%)	634 (60.15%)
ALKOHOLI ARI					
	AA	AC	CC	A	C
Muškarci	76 (16.96%)	219 (48.88%)	153 (34.15%)	371 (41.41%)	525 (58.59%)
Žene	10 (9.35%)	55 (52.40%)	42 (39.25%)	75 (35.05%)	139 (64.95%)
Ukupno	86 (15.49%)	274 (49.37%)	195 (35.13%)	446 (40.18%)	664 (59.82%)

Kao što je prikazano na slici 8, unutar kontrolne skupine ($p_{\text{genotipovi}} = 0.4445$; $p_{\text{aleli}} = 0.4931$; χ^2 -test), a niti unutar skupine ovisnika o alkoholu ($p_{\text{genotipovi}} = 0.1363$; $p_{\text{aleli}} = 0.1030$; χ^2 -test) nisu utvrđene statistički značajne razlike u raspodjeli genotipova i alela s obzirom na spol.

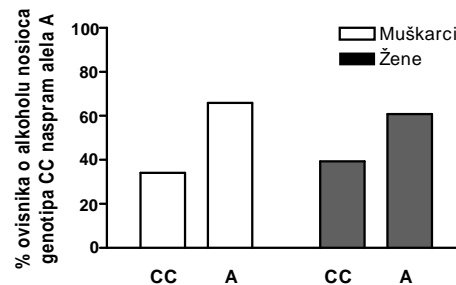
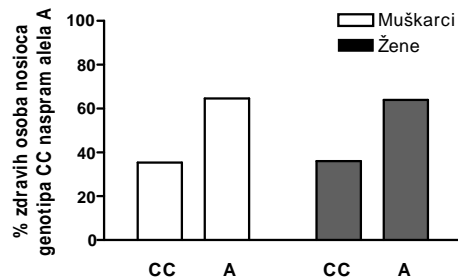
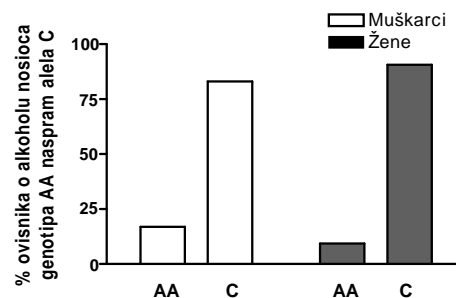
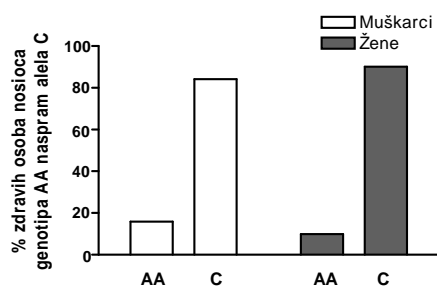


Slika 8. Raspodjela pojedinih genotipova i alela u skupini kontrolnih ispitanika i ispitanika ovisnih o alkoholu podijeljenih prema spolu

U estalost nosilaca genotipa AA naspram nosilaca alela C (CC + CA), te nosilaca genotipa CC u odnosu na nosioce alela A (AA + CA), za polimorfizam rs2832407 unutar kontrolne skupine i skupine ovisnika o alkoholu podijeljenih prema spolu, prikazana je u tablici 6.

Tablica 6. Uestalost nosilaca genotipa AA odnosno CC u skupini zdravih ispitanika i skupini ispitanika ovisnih o alkoholu podijeljenih prema spolu

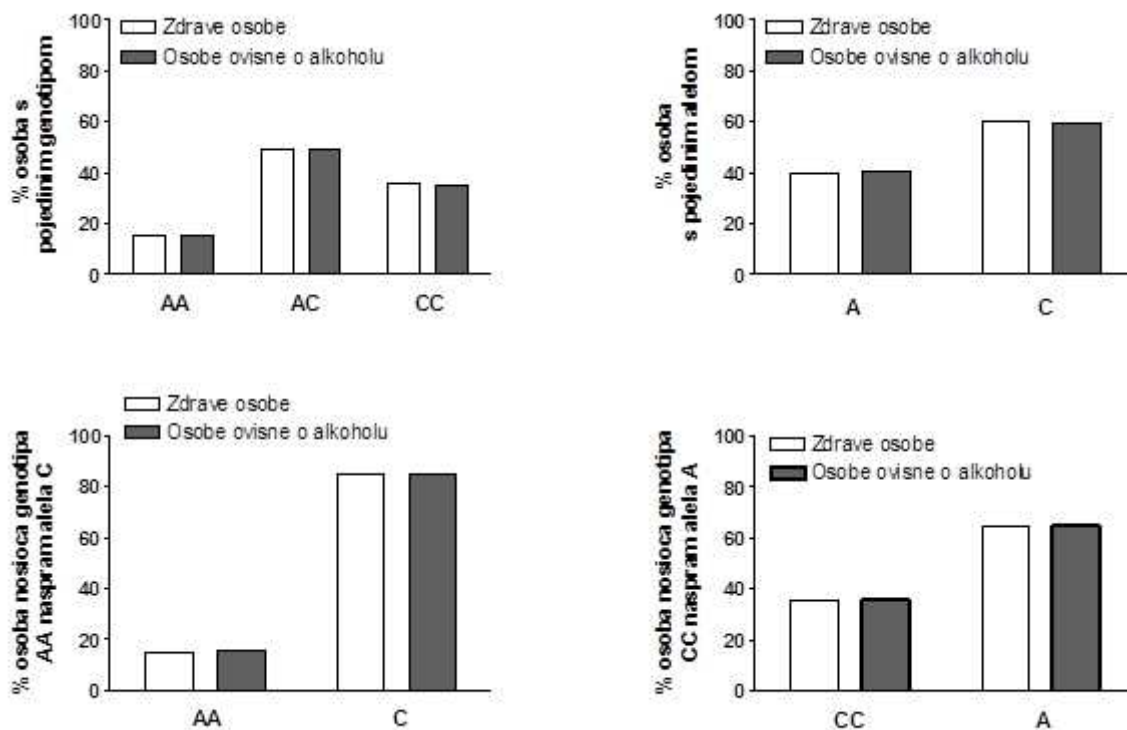
<i>KONTROLA</i>				
	AA	C (CC + AC)	CC	A (AA + AC)
Muškarci	74 (15.88%)	392 (84.12%)	165 (35.41%)	301 (64.59%)
Žene	6 (9.84%)	55 (90.16%)	22 (36.07%)	39 (63.93%)
Ukupno	80 (15.18%)	447 (84.82%)	187 (35.48%)	340 (64.52%)
<i>ALKOHOLIČARI</i>				
	AA	C (CC + AC)	CC	A (AA + AC)
Muškarci	76 (16.96%)	372 (83.03%)	153 (34.15%)	295 (65.85%)
Žene	10 (9.3%)	97 (90.65%)	42 (39.25%)	65 (60.75%)
Ukupno	86 (15.50%)	469 (84.50%)	195 (35.14%)	360 (64.86%)



Slika 9. Raspodjela nosilaca genotipa AA u odnosu na nosilaca alela C (CC + CA), odnosno nosilaca genotipa CC u odnosu na nosioce alela A (AA + CA) u skupini zdravih ispitanika i ispitanika ovisnih o alkoholu podijeljenih prema spolu

Nisu utvrđene statistički značajne razlike u raspodjeli nosilaca alela AA, odnosno CC u skupini ispitanika ovisnih o alkoholu ($p_{AA} = 0.0535$; $p_{CC} = 0.3673$; χ^2 -test), kao ni u skupini zdravih ispitanika ($p_{AA} = 0.2582$; $p_{CC} = 1.0000$; χ^2 -test) (Slika 9). Iz tog razloga u daljnjim analizama ispitanici nisu bili dijeljeni u odnosu na spol.

S obzirom da nisu utvrđene statistički značajne razlike u raspodjeli genotipova, alela i nosilaca izmeđ u spolova u skupini zdravih osoba, kao ni u skupini ispitanika ovisnih o alkoholu, rezultati dobiveni na muškarcima i ženama dalje su analizirani zajedno, odnosno nisu dijeljeni s obzirom na spol. Međutim, niti tada rezultati genotipizacije nisu ukazali na postojanje statistički značajne razlike u raspodjeli pojedinih genotipova, alela i nosioca polimorfizma rs2832407 izmeđ u ispitanika ovisnih o alkoholu i kontrolnih ispitanika ($p_{\text{genotipovi}} = 0.9866$; $p_{\text{aleli}} = 0.9095$; $p_{AA} = 0.9328$; $p_{CC} = 0.9493$, χ^2 -test) (Slika 9).



Slika 10. Raspodjela pojedinih genotipova, alela, nosioca genotipa AA u odnosu na nosioce alela C (CC + CA) i nosioca genotipa CC u odnosu na nosioce alela A (AA + CA) u skupini kontrolnih ispitanika i ispitanika ovisnih o alkoholu

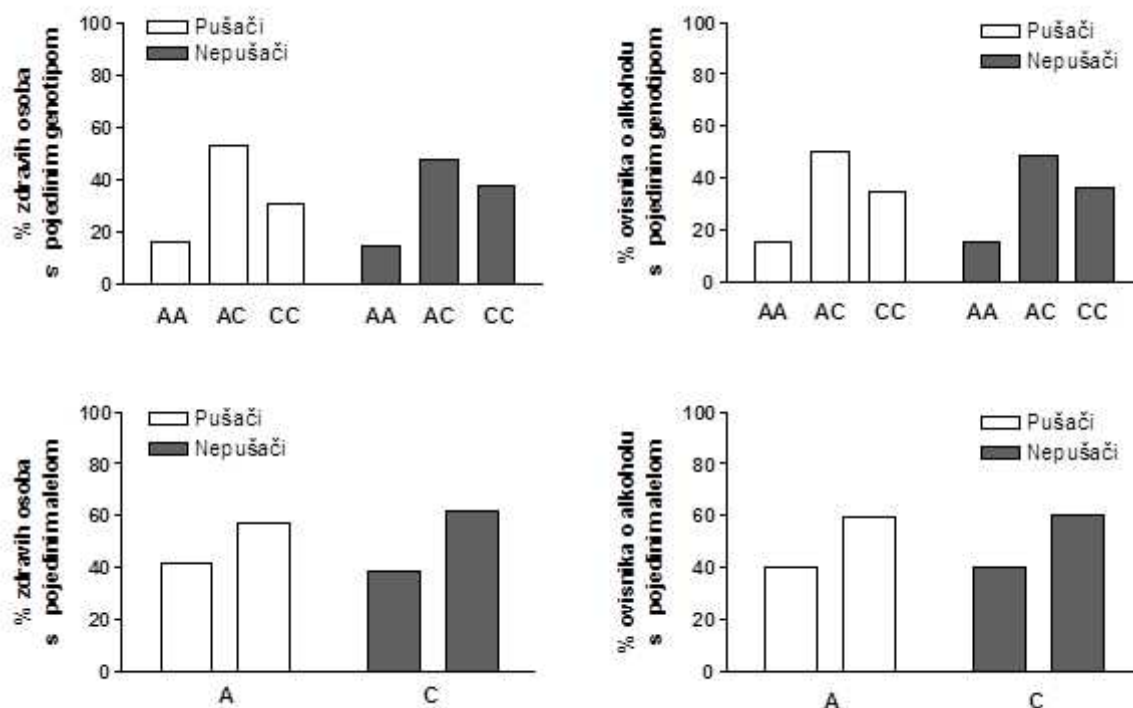
4.2.2. Raspodjela ispitanika prema puša kom statusu

Tablica 7 prikazuje raspodjelu genotipova i alela polimorfizma rs2832407 u skupini zdravih ispitanika i ispitanika ovisnih o alkoholu, podijeljenih prema puša kom statusu.

Tablica 7. Raspodjela genotipova i alela za polimorfizam rs2832407 u puša a i nepuša a u skupini zdravih osoba i ovisnika o alkoholu

<i>KONTROLA</i>					
	AA	AC	CC	A	C
Puša i	28 (16.28%)	91 (52.91%)	53 (30.81%)	147 (41.73%)	197 (57.27%)
Nepuša i	52 (14.65%)	169 (47.60%)	134 (37.75%)	273 (38.45%)	437 (61.55%)
<i>ALKOHOLIČARI</i>					
	AA	AC	CC	A	C
Puša i	51 (15.45%)	165 (50.00%)	114 (34.55%)	267 (40.45%)	393 (59.55%)
Nepuša i	35 (15.55%)	109 (48.45%)	81 (36.00%)	179 (39.78%)	271 (60.22%)

Kao što je prikazano na slici 10, nije na ena statisti ki zna ajna razlika u raspodjeli odre enih genotipova i alela izme u puša a i nepuša a unutar skupine kontrolnih ispitanika ($p_{\text{genotipovi}} = 0.2964$; $p_{\text{aleli}} = 0.2024$, χ^2 -test), kao i unutar skupine ispitanika ovisnih o alkoholu ($p_{\text{genotipovi}} = 0.9291$; $p_{\text{aleli}} = 0.8517$, χ^2 -test).



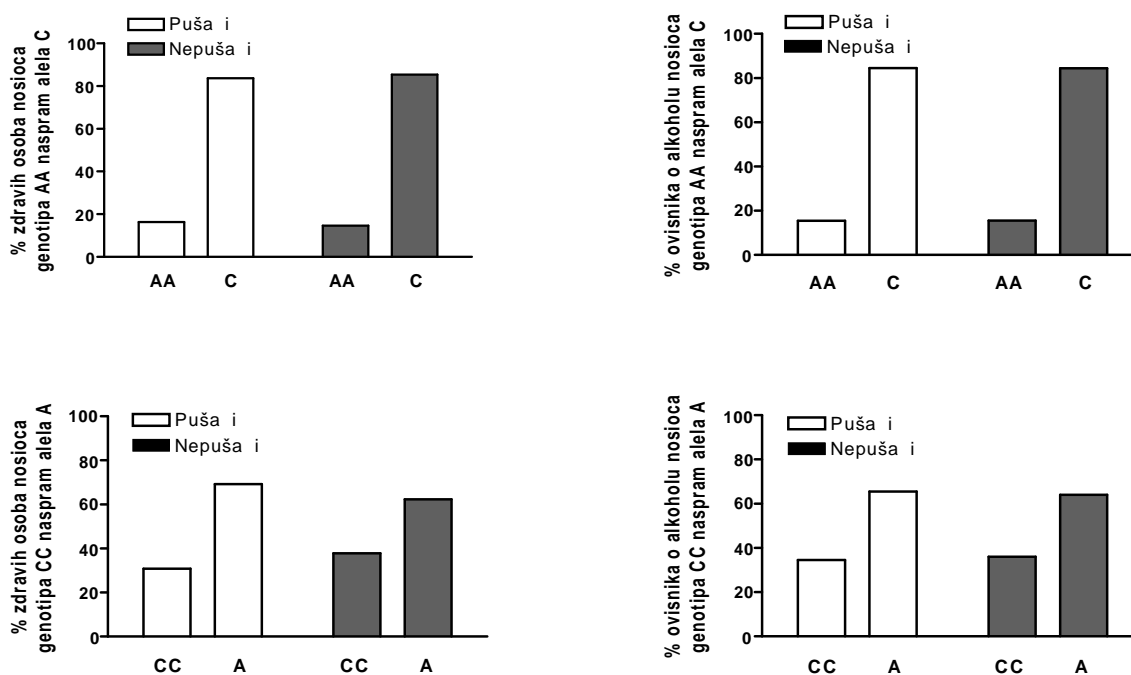
Slika 11. Raspodjela genotipova i alela izme u puša a i nepuša a u skupini zdravih ispitanika i ispitanika ovisnih o alkoholu

Tablica 8. U estalost nosioca genotipa AA odnosno CC u skupini zdravih ispitanika i ispitanika ovisnih o alkoholu podijeljenih prema puša kom statusu

<i>KONTROLA</i>				
	AA	C (CC + AC)	CC	A (AA + AC)
Puša i	28 (16.28%)	144 (83.72%)	53 (30.81%)	119 (69.19%)
Nepuša i	52 (14.65%)	303 (85.35%)	134 (37.75%)	221 (62.25%)
<i>ALKOHOLICARI</i>				
	AA	C (CC + AC)	CC	A (AA + AC)
Puša i	51 (15.45%)	279 (84.55%)	114 (34.55%)	216 (65.45%)
Nepuša i	35 (15.56%)	190 (84.44%)	81 (36.00%)	144 (64.00%)

U tablici 8, prikazana je uestalost nosioca genotipa AA naspram nosioca alela C (CC + CA), te nosioca genotipa CC u odnosu na nosioce alela A (AA + CA), unutar skupine zdravih ispitanika i ispitanika ovisnih o alkoholu, podijeljenih prema puša kom statusu.

U kontrolnoj skupini ($p_{AA} = 0.6077$; $p_{CC} = 0.1218$; χ^2 -test), kao ni u skupini ovisnika o alkoholu ($p_{AA} = 1.0000$; $p_{CC} = 0.7859$; χ^2 -test), nije utvr ena statisti ki zna ajna razlika u raspodjeli nosioca genotipa AA odnosno CC izme u ispitanika podijeljenih prema puša kom statusu (Slika 12).



Slika 12. Raspodjela nosioca genotipa AA u odnosu na nosioce alela C (CC + CA), odnosno nosioca genotipa CC u odnosu na nosioce alela A (AA + CA) izme u puša a i nepuša a u skupini kontrolnih ispitanika i ispitanika ovisnih o alkoholu

4.2.3. Raspodjela ispitanika ovisnih o alkoholu

Osobe ovisne o alkoholu podijeljene su u podskupine s obzirom na dob po etka zlouporabe alkohola (prije ili nakon 25. godine života), prema prisutnosti agresivnog ponašanja, pokušaju suicida tijekom života, te s obzirom na tip alkoholizma prema Cloningerovoj klasifikaciji (tip I i II alkoholizma).

Tablica 9. Raspodjela genotipova i alela polimorfizma rs2832407 u različitim podskupinama ispitanika ovisnih o alkoholu

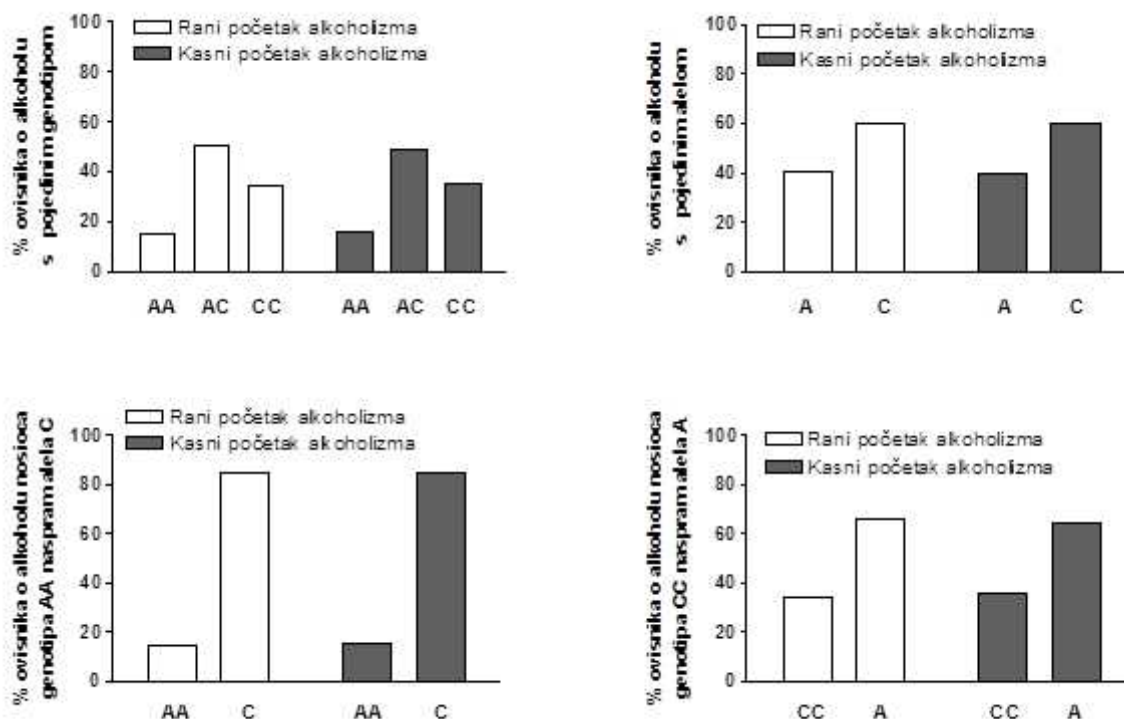
<i>ALKOHOLIČARI</i>					
	AA	AC	CC	A	C
Rani početak zlouporabe alkohola	29 (15.02%)	98 (50.78%)	66 (34.20%)	156 (40.41%)	230 (59.59%)
Kasni početak zlouporabe alkohola	57 (15.75%)	176 (48.62%)	129 (35.63%)	290 (40.05%)	434 (59.95%)
Prisutnost agresivnog ponašanja	20 (13.79%)	76 (52.41%)	49 (33.79%)	116 (40.00%)	174 (60.00%)
Odsutnost agresivnog ponašanja	66 (16.10%)	198 (48.29%)	146 (35.61 %)	330 (40.24%)	490 (59.76%)
Pokušaj samoubojstva tijekom života	12 (12.90%)	49 (52.69%)	32 (34.41%)	73 (39.25%)	113 (60.75%)
Bez pokušaja samoubojstva	74 (16.02%)	225 (48.50%)	163 (35.28%)	373 (40.37%)	551 (59.63%)
Alkoholizam tip I	75 (15.62%)	239 (49.79%)	166 (34.58%)	389 (40.52%)	571 (59.48%)
Alkoholizam tip II	11 (14.67%)	35 (46.67%)	29 (38.67%)	57 (38.00%)	93 (62.00%)

Tablica 10. Učestalost nosilaca genotipa AA u odnosu na nosioce alela C i nosilaca genotipa CC u odnosu na nosioce alela A u različitim podskupinama ispitanika ovisnih o alkoholu

<i>ALKOHOLIČARI</i>				
	AA	C (CC + AC)	CC	A (AA + AC)
Rani početak zlouporabe alkohola	29 (15.03%)	164 (84.97%)	66 (34.20%)	127 (65.80%)
Kasni početak zlouporabe alkohola	57 (15.75%)	305 (84.25%)	129 (35.63%)	233 (64.37%)
Prisutnost agresivnog ponašanja	20 (13.79%)	125 (86.21%)	49 (33.79%)	96 (66.21%)
Odsutnosti agresivnog ponašanja	66 (16.10%)	344 (83.90%)	146 (35.61 %)	264 (64.39%)
Pokušaj suicida tijekom života	12 (12.90%)	81 (87.10%)	32 (34.41%)	61 (65.59%)
Bez pokušaja samoubojstva	74 (16.02%)	388 (83.98%)	163 (35.28%)	299 (64.72%)
Alkoholizam tip I	75 (15.63%)	405 (84.37%)	166 (34.58%)	314 (65.42%)
Alkoholizam tipa II	11 (14.67%)	64 (85.33%)	29 (38.67%)	46 (61.33%)

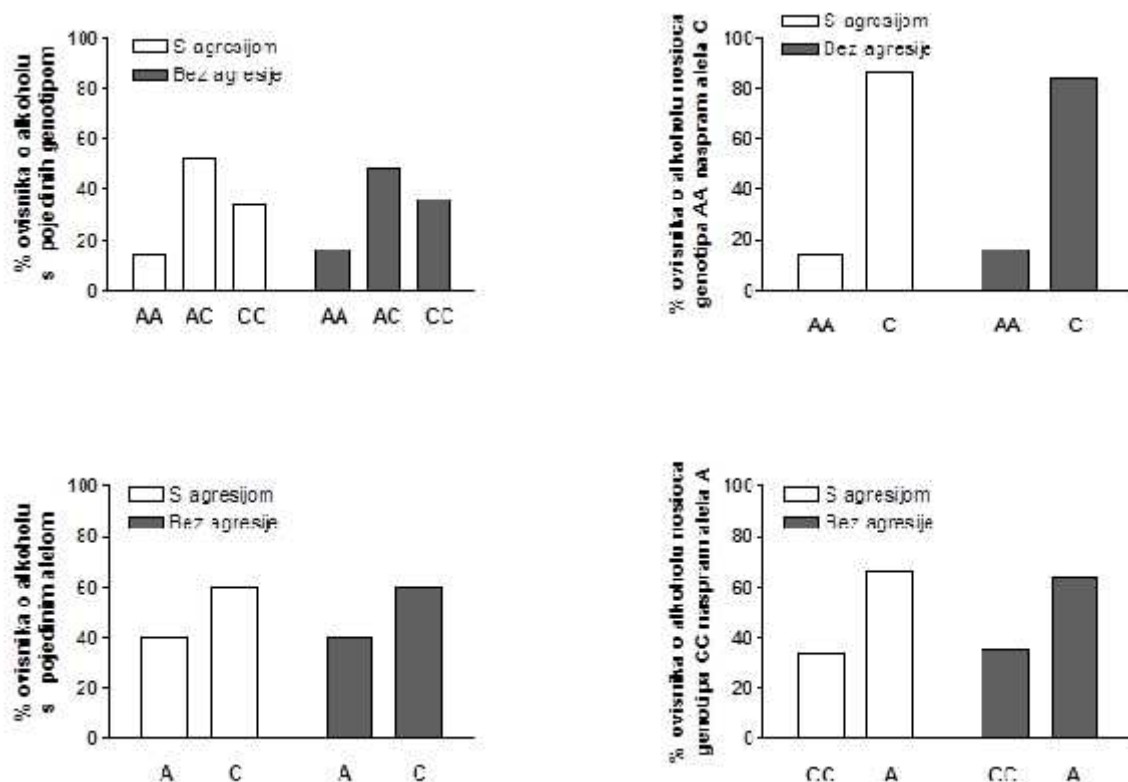
Tablica 9 prikazuje raspodjelu genotipova i alela, a tablica 10 u estalost nosioca genotipova AA u odnosu na nosioce alela C (CC + CA), te nosioce genotipa CC u odnosu na nosioce alela A (AA + CA), za svaku od navedenih podskupina alkoholi ara.

Izme u ispitanika ovisnih o alkoholu s ranim po etkom zlouporabe alkohola (prije 25. godine života) i alkoholi ara s kasnim po etkom zlouporabe alkohola (poslije 25. godine života), nisu utvr ene zna ajne razlike u raspodjeli genotipova, alela i nosioca genotipa AA odnosno nosioca genotipa CC ($p_{\text{genotipovi}} = 0.8891$; $p_{\text{aleli}} = 0.9488$; $p_{AA} = 0.9022$; $p_{CC} = 0.7797$; χ^2 -test) (Slika 13).



Slika 13. Raspodjela genotipova, alela i nosioca genotipa AA u odnosu na nosioce alela C (CC + CA), odnosno nosioca genotipa CC u odnosu na nosioce alela A (AA + CA) prema dobi po etka zlouporabe alkohola u skupini ispitanika ovisnih o alkoholu

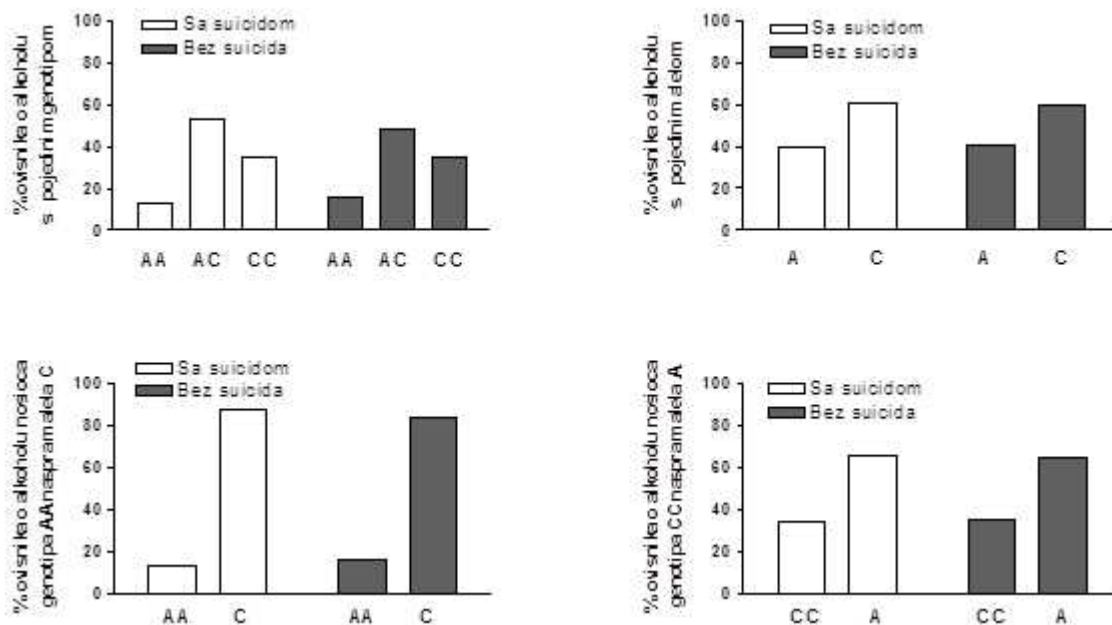
Kao što je prikazano na slici 14, raspodjela genotipova, alela i nosioca homozigotnih genotipova AA, tj. CC nije se zna ajno razlikovala u ispitanika ovisnih o alkoholu podijeljenih s obzirom na agresivno ponašanje ($p_{\text{genotipovi}} = 0.6583$; $p_{\text{aleli}} = 1.0000$; $p_{AA} = 0.5938$; $p_{CC} = 0.7616$, χ^2 -test).



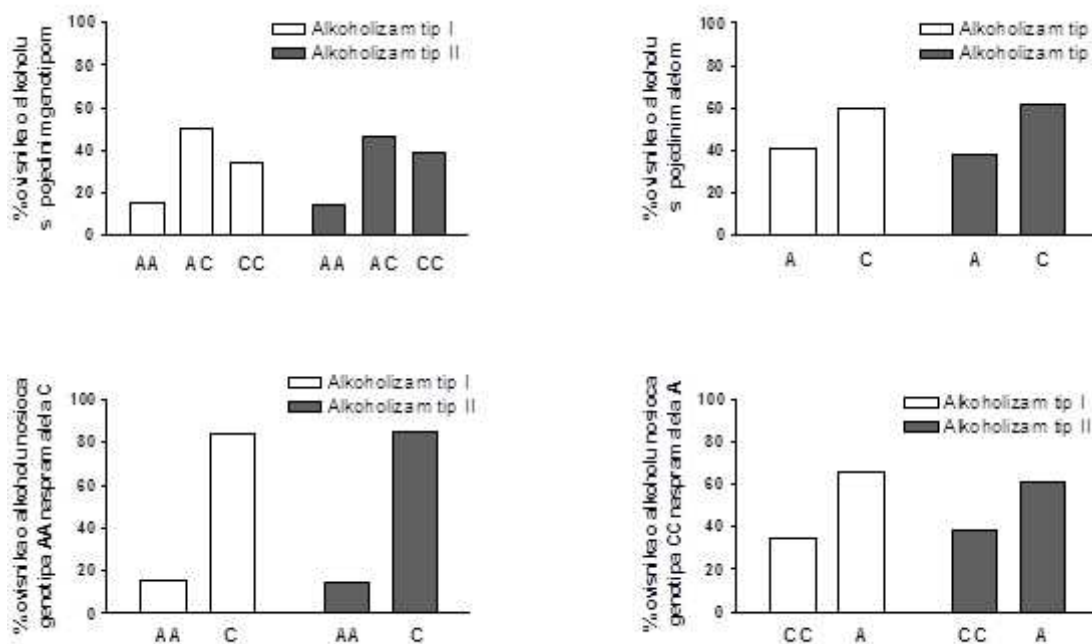
Slika 14. Raspodjela genotipova, alela i nosioca genotipa AA, odnosno nosioca genotipa CC prema prisutnosti agresije u skupini ispitanika ovisnih o alkoholu

Statisti ki zna ajna razlika u raspodjeli genotipova, alela i nosioca homozigotnih genotipova AA, odnosno CC tako er nije utvr ena u skupini ispitanika ovisnih o alkoholu podijeljenih s obzirom na pokušaj suicida tijekom života ($p_{\text{genotipovi}} = 0.6871$; $p_{\text{aleli}} = 0.8061$; $p_{AA} = 0.5312$; $p_{CC} = 0.9058$, χ^2 -test) (Slika 15).

Slika 16 prikazuje raspodjelu genotipova, alela i nosioca genotipa AA i CC u skupini ispitanika ovisnih o alkoholu podijeljenih s obzirom na tip alkoholizma prema Cloningerovoj klasifikaciji. Ni tu nisu prona ene nikakve statisti ki zna ajne razlike ($p_{\text{genotipovi}} = 0.7888$; $p_{\text{aleli}} = 0.5917$; $p_{AA} = 1.0000$; $p_{CC} = 0.5166$, χ^2 -test).



Slika 15. Raspodjela genotipova, alela i nosioca genotipa AA, odnosno nosioca genotipa CC s obzirom na pokušaj suicida u skupini ispitanika ovisnih o alkoholu



Slika 16. Raspodjela genotipova (A), alela (B) i nosioca genotipa AA (C), odnosno nosioca genotipa CC (D) s obzirom na tip alkoholizma prema Cloningerovoj klasifikaciji u skupini ispitanika ovisnih o alkoholu

5. RASPRAVA

Iako se do sada malo znalo o prilagodbama kainatnih receptora nakon kroni ne primjene alkohola, posljednjih godina kainatni receptori također su se pokazali kao značajne mete djelovanja alkohola u SŽS (Carta i sur., 2003). Naime, istraživanja pokazuju da primjena alkohola od 1 do 5 dana selektivno smanjuje osjetljivost kainatnih receptora (Dildy-Mayfield i Harris, 1992). Također je nakon kroni nog izlaganja alkoholu uočeno povećanje broja kainatnih receptora u hipokampusu, što posljedično može izazvati inhibiciju GABAergičnih interneurona tijekom sindroma ustezanja (Carta i sur., 2002). Stoga su kainatni receptori izgleda jedan od glavnih imbenika u okidanju hipokampalnih neurona, odgovornim za epileptičke napadaje uzrokovane ustezanjem, kao i za *delirium tremens* (Dietrich i sur., 1997).

Nedavna istraživanja uputila su na povezanost alkoholizma i gena za glutamatne receptore (Gass i Olive, 2008). Naime, nekoliko istraživanja pronašlo je povezanost ovisnosti o alkoholu i različitih polimorfizama u genima *GRIK1* i *GRIK3*, koji kodiraju podjedinice GluR5 i GluR7 ionotropnih glutamatnih receptora (Preuss i sur., 2006; Kranzler i sur., 2009), neophodnih za stvaranje funkcionalnih kainatnih receptora.

Kranzler i sur. (2009) su pokazali da pojedini polimorfizmi u genu *GRIK1* koji kodira za podjedinicu GluR5 glutamatnog receptora, doprinose riziku razvoja alkoholizma. Naime, ovi autori su pronašli da su tri različita polimorfizma (rs2832407 u intronu 9, rs2186305 u intronu 17 i rs2832387 u 3' regiji) (single nucleotide polymorphism, SNP) povezana s ovisnošću o alkoholu, a povezanost s polimorfizmom rs2832407 bila je posebno značajna.

Stoga smo u našem istraživanju željeli istražiti mogu li povezanost ovog polimorfizma s razvojem ovisnosti o alkoholu u ispitanika hrvatskog porijekla. Naime, rezultati genetskih istraživanja mogu se razikovati zbog različitog podrijetla ispitanika, budući da se utjecaj genetičkih i okolišnih imbenika rizika može razlikovati između pojedinih populacija. Tako na primjer uobičajeni okolišni imbenici rizika, poput razine izlaganja alkoholu i prosječne konzumacije alkohola, koji variraju između različitih zemalja, potencijalno odražavaju smanjeni, odnosno povećani značaj genetičkih imbenika u razvoju ovisnosti o alkoholu.

Iako su dosadašnja istraživanja poželjno rasvijetljavati ulogu gena kainatnih receptora u razvoju alkoholizma, potrebne su daljnje studije koje bi uključile različite etničke skupine, spolne razlike, podtipove alkoholizma, kao i brojne druge imbenike.

Za razliku od studije Kranzlera i sur. (2009) u našem istraživanju nismo utvrdili povezanost polimorfizma rs2832407 gena *GRIK1* i alkoholizma. Uz etničke razlike, naši rezultati se mogu objasniti veličinom uzorka, odabirom ispitanika, genetskom strukturom populacije, ali i raspodjelom spola. Naime u istraživanju Kranzlera i sur. (2009), u kontrolnoj skupini bilo je oko 40% muškaraca, dok je u skupini ovisnika o alkoholu bilo oko 70%, dok je u našem istraživanju broj muškaraca u obje skupine bio preko 80%. Nikakve razlike u raspodjeli genotipova i alela za polimorfizam rs2832407 nisu utvrđene između muškaraca i žena niti u kontrolnoj skupini niti u skupini osoba ovisnih o alkoholu.

Kako je utvrđeno da se alkoholizam i pušenje vrlo često javljaju u kombinaciji, te da ovisnost o alkoholu i nikotinu dijele zajedničke genetske čimbenike rizika (Bierut i sur., 2004), željeli smo istražiti postoje li razlike u raspodjeli genotipova i alela za rs2832407 polimorfizam u skupinama zdravih ispitanika i osoba ovisnih o alkoholu podijeljenih s obzirom na pušački status. Rezultati našeg istraživanja koji pokazuju značajno veći broj pušača u skupini ispitanika ovisnih o alkoholu u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0.0001$; χ^2 -test), u skladu su sa brojnim studijama koje pokazuju da su alkoholičari u većem broju i pušači u odnosu na kontrolnu skupinu. To je dosljedno radovima koji pokazuju da ovisnici o alkoholu imaju viši rizik pušenja naspram zdravih ispitanika (Schlaepfer i sur., 2008). Rezultati našeg istraživanja nisu ukazali na razlike u raspodjeli genotipova i alela za polimorfizam rs2832407 između pušača i nepušača niti u skupini zdravih ispitanika niti u skupini alkoholičara.

Alkoholizam se često povezuje s povećanim rizikom pokušaja samoubojstva, te su visoke stope pokušaja suicida utvrđene u ovisnika o alkoholu (Modesto-Lowe i sur., 2006). Stoga smo u našem istraživanju osobe ovisne o alkoholu podijelili s obzirom na suicidalno ponašanje. U našem istraživanju nismo utvrdili povezanost polimorfizma rs2832407 s pokušajem samoubojstva u alkoholičara, iako sve više autora povezuje glutamatni sustav sa suicidom (Bernstein i sur., 2013; Sequeira i sur., 2009; Freed i sur., 1993), te ukazuju da genetski čimbenici doprinose riziku pokušaja suicida (Tsai i sur., 2011).

U našem istraživanju također smo željeli utvrditi postoji li povezanost polimorfizma rs2832407 i agresivnog ponašanja alkoholičara. Naime, agresivnost osoba ovisnih o alkoholu još je jedan čimbenik koji se često isražuje u novije vrijeme (Kachadourian i sur., 2012; Klostermann i sur., 2009; Träskman-Bendz i Westling, 2005). Naši rezultati su pokazali da ne

postoje razlike u učestalosti genotipova i alela ovog polimorfizma *GRIK1* gena između alkoholičara sa i bez sklonosti agresivnom ponašanju.

Jedna od najpoznatijih klasifikacija ovisnosti o alkoholu koja pokušava preciznije definirati specifične podtipove (endofenotipove) alkoholizma (Leggio i sur., 2008) je tzv. Cloningerova klasifikacija (Cloninger i sur., 1988). Ova klasifikacija razlikuje tip I alkoholizma s relativno kasnim početkom (poslije 25. godine života), neurotičnim simptomima i minimalnim kriminalitetom, od alkoholizma tipa II s relativno ranim početkom zlouporabe alkohola (u ranim dvadesetim godinama), povišenom razinom antisocijalnog ponašanja i delikvencije koja često počinje tijekom adolescencije. Tip I alkoholizma prema Cloningerovoj klasifikaciji je umjereno nasljedan, te na njega bitno utječu okolišni čimbenici, za razliku od tipa II alkoholizma, koji se smatra nasljednim i na kojeg okolišni čimbenici imaju ograničen utjecaj (Cloninger i sur., 1988). Rani početak zlouporabe alkohola često je ozbiljniji, s povišenim rizikom vraćanja ovisnosti, kao i pojave komorbidnih poremećaja poput antisocijalnog poremećaja ličnosti (eng. *antisocial personality disorder*, ASPD) i poremećaja ponašanja (eng. *conduct disorder*) (Dick i sur., 2006; McGue i sur., 2001). U našem istraživanju nije utvrđena statistički značajna razlika u frekvenciji genotipova i alela između ispitanika ovisnih o alkoholu s ranim početkom zlouporabe alkohola i alkoholičara s kasnim početkom alkoholizma.

Iako je naše istraživanje napravljeno na relativno velikom broju ispitanika, naši rezultati nisu potvrdili prethodno pokazanu povezanost polimorfizma rs2832407 s ovisnošću o alkoholu (Kranzler i sur., 2009). To ističe važnost ovakvih istraživanja na različitim etničkim skupinama, jer se rezultati mogu razlikovati. Stoga su potrebna dodatna istraživanja koja će uključiti različite populacije i obuhvatiti još više ispitivanih parametara i to na velikom broju ispitanika.

6. ZAKLJUČAK

- Statistički značajna razlika utvrđena je u raspodjeli pušača i nepušača između alkoholičara i zdravih ispitanika. Naime, u skladu s literaturnim podacima, unutar skupine ispitanika ovisnih o alkoholu postojala je veća frekvencija pušača nego u skupini zdravih ispitanika.
- Uestalost opaženih genotipova polimorfizma rs2832407 u skupini ispitanika ovisnih o alkoholu kao i u skupini zdravih ispitanika bila je u skladu s Hardy-Weinberg-ovom ravnotežom.
- U istraživanju povezanosti polimorfizma rs2832407 gena *GRIK1* s rizikom razvoja alkoholizma nisu utvrđene statistički značajne razlike u raspodjeli genotipova i alela između osoba ovisnih o alkoholu i zdravih kontrolnih ispitanika.
- Značajne razlike u uestalosti genotipova i alela polimorfizma rs2832407 nisu utvrđene između osoba različitog spola, u skupini zdravih ispitanika, kao ni u skupini ovisnika o alkoholu, te se u naknadnim usporedbama ispitanici nisu dijelili prema spolu.
- U raspodjeli varijanti polimorfizma rs2832407 također nisu pronađene značajne razlike u skupini ispitanika ovisnih o alkoholu, kao ni u kontrolnoj skupini, podijeljenih prema pušačkom statusu u pušače i nepušače.
- Usporedbom osoba ovisnih o alkoholu prema dobi početka zlouporabe alkohola utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u frekvenciji genotipa, alela niti nosioca između alkoholičara s ranim i kasnim početkom zlouporabe alkohola.
- Kada su ispitanici ovisni o alkoholu podijeljeni prema prisustvu agresivnog, kao i suicidalnog ponašanja, analiza genotipova i alela polimorfizma rs2832407 također nije utvrdila značajne razlike između ispitivanih skupina.
- Značajne razlike u raspodjeli genotipova i alela polimorfizma rs2832407 nisu utvrđene unutar skupine alkoholičara podijeljenih na osobe sa alkoholizmom tipa I i II prema Cloningerovoj klasifikaciji.
- U svrhu razjašnjavanja uloge gena *GRIK1* u razvoju ovisnosti o alkoholu potrebna su daljnja i opsežnija istraživanja.

7. LITERATURA

- Abrahao, K.P., Ariwodola, O.J., Butler, T.R., Rau, A.R., Skelly, M.J., Carter, E., Alexander, N.P., McCool, B.A., Souza-Formigoni, M.L.O., Weiner, J.L. (2013): *Locomotor sensitization to ethanol impairs NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in the nucleus accumbens and increases ethanol self-administration*. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 33, 4834–4842.
- Bernstein, H.G., Tausch, A., Wagner, R., Steiner, J., Seeleke, P., Walter, M., Dobrowolny, H., Bogerts, B. (2013): *Disruption of Glutamate-Glutamine-GABA Cycle Significantly Impacts on Suicidal Behaviour: Survey of the Literature and Own Findings on Glutamine Synthetase*. CNS Neurol. Disord. Drug Targets. 12, 900-13.
- Bierut, L.J., Agrawal, A., Bucholz, K.K., Doheny, K.F., Laurie, C., Pugh, E., Fisher, S., Fox, L., Howells, W., Bertelsen, S., Hinrichs, A.L., Almasy, L., Breslau, N., Culverhouse, R.C., Dick, D.M., Edenberg, H.J., Foroud, T., Grucza, R.A., Hatsukami, D., Hesselbrock, V., Johnson, E.O., Kramer, J., Krueger, R.F., Kuperman, S., Lynskey, M., Mann, K., Neuman, R.J., Nöthen, M.M., Nurnberger, J.I., Jr, Porjesz, B., Ridinger, M., Saccone, N.L., Saccone, S.F., Schuckit, M.A., Tischfield, J.A., Wang, J.C., Rietschel, M., Goate, A.M., Rice, J.P. (2010): *Gene, Environment Association Studies Consortium. A genome-wide association study of alcohol dependence*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107, 5082–5087.
- Bierut, L.J., Rice, J.P., Goate, A., Hinrichs, A.L., Saccone, N.L., Foroud, T., Edenberg, H.J., Cloninger, C.R., Begleiter, H., Conneally, P.M., Crowe, R.R., Hesselbrock, V., Li, T.-K., Nurnberger, J.I., Jr, Porjesz, B., Schuckit, M.A., Reich, T. (2004): *A genomic scan for habitual smoking in families of alcoholics: common and specific genetic factors in substance dependence*. Am. J. Med. Genet. A. 124A, 19–27.
- Brown, G.L., Goodwin, F.K., Ballenger, J.C., Goyer, P.F., Major, L.F. (1979): *Aggression in humans correlates with cerebrospinal fluid amine metabolites*. Psychiatry Res. 1, 131–139.

- Buydens-Branchey, L., Branchey, M.H., Noumair, D. (1989): *Age of alcoholism onset. I. Relationship to psychopathology*. Arch. Gen. Psychiatry 46, 225–230.
- Carta, M., Ariwodola, O.J., Weiner, J.L., Valenzuela, C.F. (2003): *Alcohol potently inhibits the kainate receptor-dependent excitatory drive of hippocampal interneurons*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 6813–6818.
- Carta, M., Olivera, D.S., Dettmer, T.S., Valenzuela, C.F. (2002): *Ethanol withdrawal upregulates kainate receptors in cultured rat hippocampal neurons*. Neurosci. Lett. 327, 128–132.
- Cloninger, C.R., Sigvardsson, S., Gilligan, S.B., von Knorring, A.L., Reich, T., Bohman, M. (1988): *Genetic heterogeneity and the classification of alcoholism*. Adv. Alcohol Subst. Abuse 7, 3–16.
- Costa, E.T., Soto, E.E., Cardoso, R.A., Olivera, D.S., Valenzuela, C.F. (2000): *Acute effects of ethanol on kainate receptors in cultured hippocampal neurons*. Alcohol. Clin. Exp. Res. 24, 220–225.
- Dick, D.M., Bierut, L., Hinrichs, A., Fox, L., Bucholz, K.K., Kramer, J., Kuperman, S., Hesselbrock, V., Schuckit, M., Almasy, L., Tischfield, J., Porjesz, B., Begleiter, H., Nurnberger, J., Jr, Xuei, X., Edenberg, H.J., Foroud, T. (2006): *The role of GABRA2 in risk for conduct disorder and alcohol and drug dependence across developmental stages*. Behav. Genet. 36, 577–590.
- Dietrich, D., Beck, H., Kral, T., Clusmann, H., Elger, C.E., Schramm, J. (1997): *Metabotropic glutamate receptors modulate synaptic transmission in the perforant path: pharmacology and localization of two distinct receptors*. Brain Res. 767, 220–227.
- Dildy-Mayfield, J.E., Harris, R.A. (1992): *Acute and chronic ethanol exposure alters the function of hippocampal kainate receptors expressed in Xenopus oocytes*. J. Neurochem. 58, 1569–1572.
- Förster, T. (1948): *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*. Ann. Phys. 437, 55–75.

- Freed, W.J., Dillon-Carter, O., Kleinman, J.E. (1993): *Properties of [3H]AMPA binding in postmortem human brain from psychotic subjects and controls: increases in caudate nucleus associated with suicide*. Exp. Neurol. 121, 48–56.
- Gass, J.T., Olive, M.F. (2008): *Glutamatergic substrates of drug addiction and alcoholism*. Biochem Pharmacol 1: 218-265.
- Goldman, D., Oroszi, G., Ducci, F. (2005): *The genetics of addictions: uncovering the genes*. Nat. Rev. Genet. 6, 521–532.
- Guo, Y., Wang, H-L., Xiang, X-H., Zhao, Y. (2009): *The role of glutamate and its receptors in mesocorticolimbic dopaminergic regions in opioid addiction*. Public Health Resources. Paper 106.
- Hamilton, M. (1960): *A rating scale for depression*. J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. 23-56.
- Holmes, A., Fitzgerald, P.J., MacPherson, K.P., DeBrouse, L., Colacicco, G., Flynn, S.M., Masneuf, S., Pleil, K.E., Li, C., Marcinkiewicz, C.A., Kash, T.L., Gunduz-Cinar, O., Camp, M. (2012): *Chronic alcohol remodels prefrontal neurons and disrupts NMDAR-mediated fear extinction encoding*. Nat. Neurosci. 15, 1359–1361.
- Kachadourian, L.K., Homish, G.G., Quigley, B.M., Leonard, K.E. (2012): *Alcohol expectancies, alcohol use, and hostility as longitudinal predictors of alcohol-related aggression*. Psychol. Addict. Behav. J. Soc. Psychol. Addict. Behav. 26, 414–422.
- Kalsi, G., Prescott, C.A., Kendler, K.S., Riley, B.P. (2009): *Unraveling the molecular mechanisms of alcohol dependence*. Trends Genet. TIG 25, 49–55.
- Karoll, B.R. (2002): *Women and Alcohol-Use Disorders*. Journal of Social Work. 2: 337–356.
- Kimura, M., Higuchi, S.(2011): *Genetics of alcohol dependence*. Psychiatry Clin. Neurosci. 65, 213–225.
- Klostermann, K., Mignone, T., Chen, R. (2009): *Subtypes of alcohol and intimate partner violence: a latent class analysis*. Violence Vict. 24, 563–576.
- Köhnke, M.D. (2007): *Approach to the genetics of alcoholism: a review based on pathophysiology*. Biochemical pharmacology. 75: 16 0 – 17 7.

- Köhnke, M.D. (2008): *Approach to the genetics of alcoholism: a review based on pathophysiology*. Biochem. Pharmacol. 75, 160–177.
- Kranzler, H.R., Gelernter, J., Anton, R.F., Arias, A.J., Herman, A., Zhao, H., Burian, L., Covault, J. (2009): *Association of markers in the 3' region of the GluR5 kainate receptor subunit gene (GRIK1) to alcohol dependence*. Alcohol Clin Exp Res. 33: 925–930.
- Lakowicz, J.R. (2007): *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer.
- Leggio, L., Kenna, G.A., Swift, R.M. (2008): *New developments for the pharmacological treatment of alcohol withdrawal syndrome. A focus on non-benzodiazepine GABAergic medications*. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 32, 1106–1117.
- Lovinger, D.M., White, G., Weight, F.F. (1989): *Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons*. Science 243, 1721–1724.
- McGue, M., Iacono, W.G., Legrand, L.N., Malone, S., Elkins, I. (2001): *Origins and consequences of age at first drink. I. Associations with substance-use disorders, disinhibitory behavior and psychopathology, and P3 amplitude*. Alcohol. Clin. Exp. Res. 25, 1156–1165.
- McGue, M. (1999): *Phenotyping alcoholism*. Alcohol. Clin. Exp. Res. 23, 757–758.
- McGue, M. (1999): *The behavioral genetics of alcoholism*. Current Directions in Psychological Science 8:109–115.
- Meinhardt, M.W., Hansson, A.C., Perreau-Lenz, S., Bauder-Wenz, C., Stählin, O., Heilig, M., Harper, C., Drescher, K.U., Spanagel, R., Sommer, W.H. (2013). *Rescue of infralimbic mGluR2 deficit restores control over drug-seeking behavior in alcohol dependence*. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 33, 2794–2806.
- Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F. (1988): *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. Nucleic Acids Res. 16, 1215. Modesto-Lowe, V., Brooks, D., Ghani, M., 2006. Alcohol dependence and suicidal behavior: from research to clinical challenges. Harv. Rev. Psychiatry 14, 241–248.

- Möykkynen, T., Korpi, E.R., Lovinger, D.M. (2003): *Ethanol inhibits alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor function in central nervous system neurons by stabilizing desensitization*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 306, 546–555.
- Oroszi, G., Goldman, D. (2004): *Alcoholism: genes and mechanisms*. Pharmacogenomics 5, 1037–1048.
- Preuss, U.W., Zill, P., Koller, G., Bondy, B., Hesselbrock, V., Soyka, M. (2006): *Ionotropic glutamate receptor gene GRIK3 SER310ALA functional polymorphism is related to delirium tremens in alcoholics*. Pharmacogenomics J. 6, 34–41.
- Radel, M., Goldman, D. (2001): *Pharmacogenetics of alcohol response and alcoholism: the interplay of genes and environmental factors in thresholds for alcoholism*. Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem. 29, 489–494.
- Ray, L.A., Miranda, R., MacKillop, J., McGeary, J., Tidey, J., Rohsenow, D.J., Gwaltney, C., Swift, R., Monti, P.M. (2009): *A preliminary pharmacogenetic investigation of adverse events from topiramate in heavy drinkers*. Exp Clin Psychopharmacol. 17: 122–129.
- Schlaepfer, I.R., Hoft, N.R., Ehringer, M.A. (2008): *The genetic components of alcohol and nicotine co-addiction: from genes to behavior*. Curr. Drug Abuse Rev. 1, 124–134.
- Sequeira, A., Mamdani, F., Ernst, C., Vawter, M.P., Bunney, W.E., Lebel, V., Rehal, S., Klempan, T., Gratton, A., Benkelfat, C., Rouleau, G.A., Mechawar, N., Turecki, G. (2009): *Global brain gene expression analysis links glutamatergic and GABAergic alterations to suicide and major depression*. PloS One 4, e6585.
- Testino, G. (2008): *Alcoholic diseases in hepato-gastroenterology: a point of view*. Hepatogastroenterology. 55, 371–377.
- Testino, G., Borro, P. (2010): *Alcohol and gastrointestinal oncology*. World J. Gastrointest. Oncol. 2: 322–325.
- Thomasson, H.R., Edenberg, H.J., Crabb, D.W., Mai, X.L., Jerome, R.E., Li, T.K., Wang, S.P., Lin, Y.T., Lu, R.B., Yin, S.J. (1991): *Alcohol and aldehyde dehydrogenase genotypes and alcoholism in Chinese men*. Am. J. Hum. Genet. 48, 677–681.

Träskman-Bendz, L., Westling, S. (2005): *The psychobiology of aggressive behaviour*. Adv. Health Econ. Health Serv. Res. 16, 3–14.

Tsai, S.-J., Hong, C.-J., Liou, Y.-J. (2011): *Recent molecular genetic studies and methodological issues in suicide research*. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 35, 809–817.

Vengeliene, V., Bilbao, A., Molander, A., Spanagel, R. (2008): Neuropharmacology of alcohol addiction. British Journal of Pharmacology. 154: 299–315.

Voglis, G., Tavernarakis, N. (2006): *The role of synaptic ion channels in synaptic plasticity*. EMBO Rep. 7:1104-10.

Wetterling, T., Weber, B., Depfenhart, M., Schneider, B., Junghanns, K. (2006): *Development of a rating scale to predict the severity of alcohol withdrawal syndrome*. Advance Access publication. 41: 611–615.

WHO (2011): *Global status report on alcohol and health*. WHO Press.

Woodward, J.J. (2000): *Ethanol and NMDA receptor signaling*. Crit. Rev. Neurobiol. 14, 69–89.

<http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/alcoholism/basics/definition/con-20020866>

<http://www.dnavision.com/taqman-genotyping-assays.php>

8. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci	
Ime / Prezime	Filip Martinez
Adresa(e)	Beletinec, Radni ka 19, 42214 Sv. Ilija.
Telefonski broj(evi)	Tel: 042/749-288 Mob:098-731/2216
E-mail	filip.martinez11@gmail.com
Državljanstvo	Hrvatsko
Datum ro enja	24.01.1991.
Spol	Muški
Radno iskustvo	
	xxxx
Datumi	xxxx
Zanimanje ili radno mjesto	xxxx
Glavni poslovi i odgovornosti	xxxx
Naziv i adresa poslodavca	xxxx
Vrsta djelatnosti ili sektor	xxxx
Obrazovanje i osposobljavanje	
	Preddiplomski studij: Znanosti o okolišu
Datumi	2009-2013
Naziv dodijeljene kvalifikacije / zvanje	Prvostupnik znanosti o okolišu
Glavni predmeti / ste ene profesionalne vještine	Osnovna biološka, geološka i geografska znanja, terenski rad, šire poznavanje me usobne interakcije izme u bioloških, geoloških i kemijskih elemenata okoliša.
Naziv i vrsta ustanove pružatelja obrazovanja i osposobljavanja	Prirodoslovno-matemati ki fakultet
Razina prema nacionalnoj ili međunarodnoj klasifikaciji	VSS
Osobne vještine i kompetencije	
Materinski jezik	Hrvatski
Drugi jezik(ci)	Engleski, Njema ki

Samoprocjena	Razumijevanje		Govor				Pisanje	
<i>Europska razina (*)</i>	Slušanje		itanje		Govorna interakcija		Govorna produkcija	
<u>Engleski jezik</u>	C2		C2		C2		C2	
<u>Njemački jezik</u>	B1		B1		A2		A2	

(*) [Zajednički europski referentni okvir za jezike](#)

Društvene vještine i kompetencije	Komunikativan sam i lako se prilagođavam sugovorniku. Uvijek sam spreman pomoći ljudima kojima je pomoć potrebna.
Organizacijske vještine i kompetencije	Rad na selu me naučio kako organizirati ljude i vrijeme da bi se posao obavio što brže i učinkovitije.
Tehničke vještine i kompetencije	Znam koristiti različite alate za obradu metala i drva.
Računalne vještine i kompetencije	Računalno sam pismen, znam koristiti nekoliko programa za modeliranje i stvaranje tekstura.
Umjetničke vještine i kompetencije	Imam dobru ruku i prilično dobro crtam olovkom.
Druge vještine i kompetencije	Bavim se bavljenjem vještinama i razumijem se u uzgoj voćki, povrća i biljaka.
Vozačka dozvola	Trenutno polazim vozački ispit za B kategoriju.
Dodatne informacije	
Dodaci	
Datum popunjavanja ili zadnjeg ažuriranja životopisa	03.09.2014
Potpis	